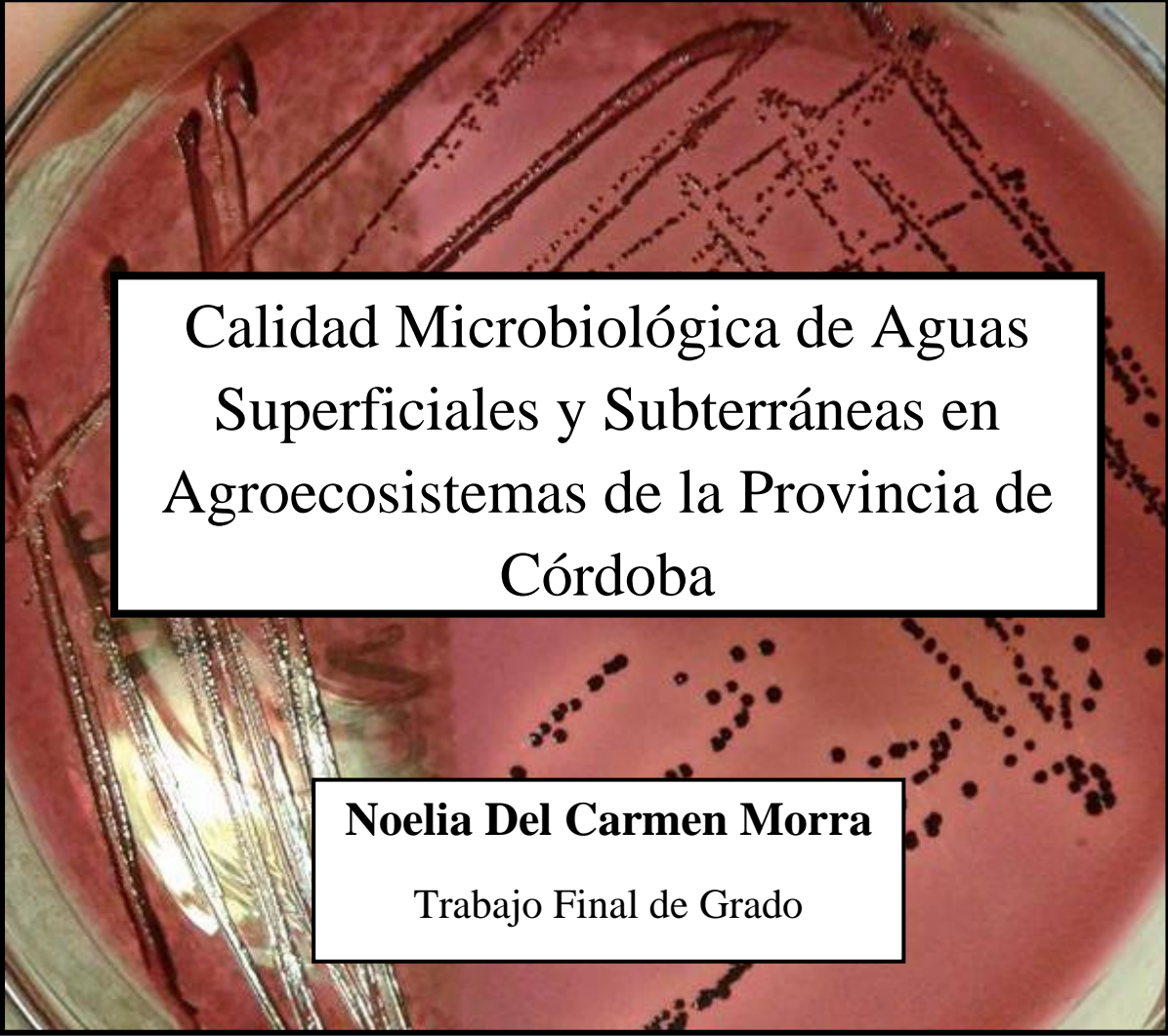




Universidad Nacional de Río Cuarto  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales  
Departamento de Microbiología e Inmunología

A photograph of a petri dish containing a bacterial culture on a red agar medium. The culture shows several distinct, dark, streaked patterns across the surface of the agar, indicating the growth of microorganisms. The petri dish is tilted, and the agar surface is visible.

# Calidad Microbiológica de Aguas Superficiales y Subterráneas en Agroecosistemas de la Provincia de Córdoba

**Noelia Del Carmen Morra**

Trabajo Final de Grado

Directora: Mg. Daniela Lombardo

Co-Directora: Dra. María Laura Gambero

2019

Trabajo de Tesis de Grado para optar al título de **MICROBIOLOGA**, bajo la dirección de la Mg. Daniela Lombardo y la co-dirección de la Dra. María Laura Gambero. Realizado en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos.

Tesista

Noelia del Carmen Morra .....

Directora

Mg. Daniela Lombardo .....

Co-Directora

Dra. María Laura Gambero .....

Miembros del Jurado

Mg. Daniela Lombardo .....

Dra. Claudia Raspanti .....

Dra. Cristina Torres .....

*A mi familia con todo mi amor*

## Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, por darme la oportunidad de estudiar y cumplir mis metas, por motivarme en los momentos difíciles y por apoyarme durante la carrera. Quiero agradecer a mi mamá y a mi papá por ser mi inspiración.

A mi mejor amiga, Marina Bonacci, por compartir tantos años de amistad, por acompañarme en la carrera y por hacerme sonreír todos los días.

A mi novio, Max Cejuela, por ayudarme a ver las cosas desde otros ángulos, por escucharme, comprenderme y motivarme.

A los que me apoyaron durante la carrera y hoy ya no están presentes.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitirme estudiar una carrera que me apasiona y por darme la posibilidad de cumplir uno de mis objetivos a través de las enseñanzas que brindo.

Al equipo de trabajo que tuve en la investigación y desarrollo de esta tesis, a mi directora Daniela Lombardo y a mi codirectora Laura Gambero, por hacerme sentir cómoda, por aclarar mis dudas y por guiarme en este recorrido. A mis jurados Claudia Raspanti y Cristina Torres, les agradezco por la comprensión, el apoyo y la paciencia que me tuvieron.

A todas las personas con las que me cruce en esta etapa, las que me ayudaron, las que me dieron su confianza y con las que compartí tantos momentos. A todas ellas, GRACIAS.

## RESUMEN

El agua es necesaria para las actividades agrícolas, industriales y para el uso doméstico. Usualmente para el abastecimiento de agua potable se utilizan fuentes superficiales y subterráneas, pero estas pueden contaminarse con efluentes, descargas industriales y a través de las escorrentías de los campos. La contaminación biológica es importante porque puede producir distintas patologías como gastroenteritis, cólera, disentería, fiebre tifoidea y poliomielitis.

En Argentina, gran parte del territorio es árido y allí la principal fuente de agua es la subterránea. Hay dos tipos de acuíferos, los libres o freáticos que son cercanos a la superficie y los confinados o cautivos que están a mayor profundidad. Tanto las fuentes de agua superficiales como subterráneas se ven amenazadas por la contaminación, que puede ser de origen agropecuario, urbano y domiciliario, o industrial.

En la provincia de Córdoba hay ríos, arroyos y lagos, pero gran parte del suministro de agua proviene de fuentes subterráneas. Estas poseen problemas de calidad natural y derivados de la contaminación antrópica, que se han estudiado en las últimas dos décadas en el sur de la provincia. Además, las fuentes superficiales (ríos, lagos y arroyos), reciben efluentes y escurrimientos, que deben evaluarse.

Con el objetivo de efectuar el análisis microbiológico de agua, se realizó la búsqueda de marcadores biológicos de contaminación tales como microorganismos aerobios mesófilos viables totales, coliformes totales y fecales (o termotolerantes), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

*E. coli* es un indicador de contaminación fecal. Está presente en el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente en grandes cantidades y su proliferación en ambientes acuáticos resulta poco probable. Por estos motivos es un indicador adecuado y es una prueba concluyente de contaminación fecal reciente. Sin embargo la sola presencia de *E. coli* no da indicios de su origen, para ello se utilizan diversas técnicas de rastreo microbiano tales como, el análisis de perfiles de resistencia a antibióticos y de patrones genéticos (*fingerprinting*).

Los antibióticos en veterinaria se utilizan para prevenir enfermedades y como promotores del crecimiento, lo que genera resistencia. Como los antibióticos utilizados difieren de los aplicados en medicina humana, hay una diferencia fenotípica en los perfiles de resistencia de las bacterias según su origen. En base a esto, se utilizó la técnica del antibiograma para el rastreo del origen de la contaminación, pero esta presenta limitaciones, por lo que se complementó con métodos de caracterización genotípica. Estas técnicas analizan las diferencias genéticas específicas de los microorganismos. Una de ellas es la técnica de PCR basada en la secuencia de elementos repetitivos (rep-PCR), en la cual se utilizan primers para ampliar regiones específicas del genoma bacteriano, produciendo patrones genéticos (*fingerprints*), permitiendo la identificación de cepas bacterianas.

El área de estudio es un ámbito geológico muy particular por la presencia de dos megabloques geológicos: el bloque hundido y el bloque elevado. Estas características hacen que las fuentes de agua de la zona tengan diferentes vulnerabilidades intrínsecas (susceptibilidad del medio) frente a las distintas fuentes de contaminación y, por lo tanto, se ven afectadas de manera desigual ante las distintas actividades humanas.

Los resultados de esta investigación mostraron que, los porcentajes de muestras aptas para el consumo fueron de 25% en acuíferos freáticos, (12,5% en el bloque hundido y 50% en el bloque

elevado) y 75% en acuíferos confinados. Con respecto a las aguas superficiales, ninguna fue apta para consumo.

La mayoría de las cepas de *E. coli* fueron resistentes a cefalotina (50%) y a ampicilina (57,7%), por lo que la contaminación fecal podría ser de origen animal.

En el análisis genotípico se obtuvieron 5 patrones con un rango de 2 a 6 bandas, que se agruparon en 3 clusters: A (D3, D9, D28 (2) y D13); B (D4 (2) y D10); y C (D28 (1) y D11). La cepa D4 (1) no perteneció a ninguno.

Las técnicas de rastreo de origen microbiano fenotípicas y genotípicas, resultaron complementarias porque ambas metodologías, utilizadas en conjunto con estudios hidrodinámicos y usos del territorio, permitieron realizar una buena interpretación de las probables fuentes contaminantes, separando posible influencia humana o animal.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Disponibilidad y usos del agua.....	1
1.2. Agua subterránea.....	2
1.2.1. Características generales.....	2
1.2.2. Tipos de acuíferos: libres y confinados.....	3
1.3. Contaminación del agua y sus problemáticas.....	4
1.3.1. Importancia de la contaminación de origen agropecuaria.....	7
1.4. Calidad de agua.....	8
1.4.1. Calidad bacteriológica.....	8
1.5. Caracterización de <i>Escherichia coli</i> .....	14
1.5.1. Caracterización fenotípica: Resistencia a antibióticos.....	14
1.5.1.1. El uso de antibióticos en la actividad ganadera.....	16
1.5.2. Caracterización genotípica.....	18
1.6. Situación de los recursos hídricos en la provincia de Córdoba.....	19
2. HIPÓTESIS.....	21
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo General.....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1. Área de estudio.....	22
4.2. Etapa inicial.....	23
4.3. Etapa de campo.....	23
4.3.1. Recolección de las muestras de agua.....	24
4.3.2. Descripción del entorno.....	24
4.4. Etapa de laboratorio.....	24
4.4.1. Análisis microbiológico de aguas.....	24
4.4.1.1. Recuento de microorganismos aerobios mesófilas viables totales...	25
4.4.1.2. Recuento de bacterias coliformes totales.....	25
4.4.1.3. Recuento de bacterias coliformes termotolerantes (o fecales).....	25
4.4.1.4. Determinación de la presencia o ausencia de <i>Escherichia coli</i> .....	26
4.4.1.5. Determinación de la presencia o ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26

4.4.2. Perfiles de resistencia a antimicrobianos de <i>Escherichia coli</i> .....	27
4.4.2.1. Caracterización fenotípica de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas.....	27
4.4.2.2. Análisis de resistencia a antibióticos.....	27
4.4.3. Composición de los medios de cultivo.....	28
4.4.4. Conservación de cepas.....	35
4.4.5. Caracterización molecular de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de muestras de agua.....	35
4.4.5.1. Metodología de extracción de ADN.....	35
4.4.5.2. Verificación del método de extracción.....	36
4.4.5.3. Reacción de PCR.....	37
4.4.5.4. Interpretación de los perfiles genéticos.....	39
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
5.1. Análisis bacteriológico de agua subterránea y superficial.....	40
5.1.1. Agua subterránea.....	40
5.1.1.1. Acuífero freático.....	40
5.1.1.2. Acuífero confinado.....	43
5.1.2. Agua superficial.....	44
5.1.3. Aptitud de consumo humano del total de muestras de agua.....	47
5.2. Resistencia a antimicrobianos de cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	49
5.2.1. Cepas de <i>E. coli</i> aisladas de aguas subterráneas.....	49
5.2.1.1. Acuífero freático.....	49
5.2.1.2. Acuífero confinado.....	52
5.2.2. Cepas de <i>E. coli</i> aisladas de aguas superficiales.....	52
5.3. Perfiles genéticos de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de aguas de acuífero libre.....	55
5.3.1. Extracción del ADN genómico.....	55
5.3.2. BOX-PCR: Caracterización de los productos de amplificación.....	56
5.3.3. Análisis de clústeres de los perfiles genéticos obtenidos por BOX-PCR.....	56
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>62</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>70</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Estimación de la distribución del agua global.....	1
Figura 2: Comportamiento de los distintos tipos de acuíferos.....	4
Figura 3: Área de estudio y ubicación de los sitios de muestreos.....	23
Figura 4: Sitio de muestreo DC5.....	43
Figura 5: Arroyos: Santa Catalina, Corralito y Los Jagüeles.....	44
Figura 6: Porcentajes de RAT en el total de muestras de agua analizadas.....	48
Figura 7: Porcentajes de CT y CTT en el total de muestras de agua analizadas.....	48
Figura 8: Evaluación de susceptibilidad a antibióticos de cepas de E. coli aisladas del acuífero freático.....	49
Figura 9: Evaluación de susceptibilidad a antibióticos de cepas de E. coli aisladas de aguas superficiales.....	53
Figura 10: Gel de agarosa 0,8 % con ADN bacteriano extraído de cepas de E. coli aisladas de muestras de agua de acuífero libre.....	55
Figura 11. Frecuencia (%) de los productos de amplificación por BOX-PCR.....	56
Figura 12. Productos de amplificación de ADN por BOX-PCR.....	57
Figura 13: Dendrograma y perfiles genéticos de productos de amplificación mediante BOX-PCR de cepas de E. coli aisladas de aguas de acuífero libre.....	58
Figura 14: Agar EMB.....	70
Figura 15: Prueba del Indol.....	70
Figura 16: Prueba Rojo de Metilo.....	71
Figura 17: Prueba del Citrato Sódico.....	71
Figura 18 TSI ácido/ácido con formación de gas.....	71
Figura 19: Prueba de Lisina.....	72
Figura 20: Ureasa Negativa.....	72
Figura 21: Fermentación de los azúcares.....	72
Figura 22: Medio de cultivo Cetrimide.....	73

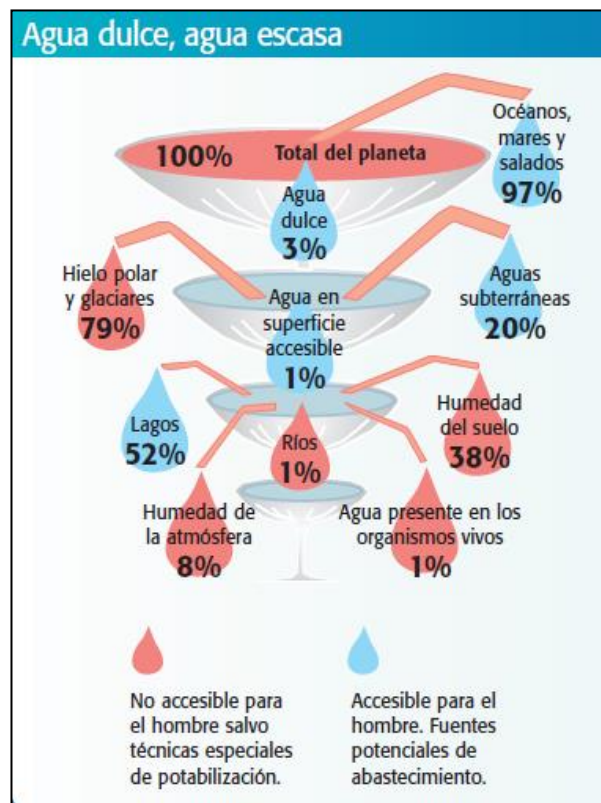
## ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Empleos del agua para uso humano.....	2
Tabla 2: Microorganismos patógenos transmitidos por agua.....	6
Tabla 3: Indicadores bacteriológicos y límites establecidos por el CAA.....	9
Tabla 4: Antimicrobianos utilizados en la determinación de susceptibilidad.....	28
Tabla 5: Protocolo de reacción de BOX-PCR.....	37
Tabla 6: Resultados de parámetros bacteriológicos determinados en el acuífero freático.....	40
Tabla 7: Resultados de parámetros bacteriológicos del agua de acuíferos confinados...	43
Tabla 8: Resultados de parámetros bacteriológicos de aguas superficiales.....	44
Tabla 9: Evaluación de susceptibilidad de cepas de E. coli aisladas del acuífero confinado.....	52

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Disponibilidad y usos del agua

El agua es esencial para la vida y está presente en nuestro planeta, pero la mayor parte (97%) es salada. Solo el 3% corresponde a agua dulce, la cual generalmente se encuentra en glaciares y nieve. Debido a esto, la principal fuente de agua que utiliza la población a diario corresponde a solo un 21% del agua dulce del planeta, con un 20% que proviene de fuentes subterráneas (Figura 1) (Blarasin y Cabrera, 2005). Esta situación empeora considerando el crecimiento de la población y la degradación de los ambientes naturales, por lo que es difícil asegurar que en un futuro se podrá suministrar agua segura a nivel mundial (OMS y UNICEF, 2017).



**Figura 1:** Estimación de la distribución del agua global.

El agua es necesaria para realizar actividades agrícolas, industriales y para su consumo doméstico (Tabla 1). Sin embargo, según la Dirección Nacional de Agua Potable y Saneamiento (MSAL, 2017), el 20% de la población mundial carece de agua apta para el consumo. De hecho, es una realidad mundial que muchas enfermedades en países en desarrollo son atribuidas a la falta de abastecimiento de agua potable y de sistemas adecuados de saneamiento (MSAL, 2018). Se estima que 2,1 billones de

personas no poseen un suministro de agua potable manejada de forma segura y de estos 844 millones carecen de un servicio básico de agua potable (agua de una fuente mejorada, localizada a no más de 30 minutos de viaje), 263 millones tienen un servicio limitado (agua potable de una fuente mejorada, localizada a más de 30 minutos de viaje) y 159 millones de personas recogen agua superficial no tratada de ríos, presas, lagos, estanques, arroyos o canales (Slaymaker y Johnston , 2018).

**Tabla 1:** Empleos del agua para uso humano

Uso	Porcentaje (%)
<b>Agricultura (principalmente para riego)</b>	69-75
<b>Industrial</b>	22-23
<b>Uso doméstico: hogar, agua para beber, saneamiento</b>	4-8

MSAL, 2017

La mejora del abastecimiento, saneamiento y la gestión del agua puede impulsar el crecimiento económico de los países y contribuir en gran medida a la reducción de la pobreza. En el año 2010 la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció al abastecimiento y saneamiento del agua como un derecho humano para que todas las personas tengan la posibilidad de disponer de agua de forma continua, en cantidades suficientes, de buena calidad y físicamente accesible, para uso personal y doméstico (OMS y UNICEF, 2017).

## 1.2. Agua subterránea

### 1.2.1. Características generales

Como se describió anteriormente, aunque el agua abunda en el planeta tierra, la que es de utilidad para el consumo es escasa. El agua se encuentra en todos los estados físicos (sólido, líquido y gaseoso) y cumple con un ciclo hidrológico en donde su cantidad no varía pero su estado, composición y disponibilidad, sí lo hacen. Al no presentar variaciones en su cantidad, se considera un recurso renovable, pero éste debe ser cuidado ya que otros factores como el tiempo que tardan en reponerse las reservas, sí varían. En el caso del agua subterránea, el tiempo de renovación puede tardar semanas, cientos o miles de años (Blarasin y Cabrera, 2005; MSAL, 2018).

En el subsuelo existen dos zonas diferentes, la no saturada que contiene agua y aire en sus poros y la zona saturada o acuífero que solo posee agua. Por definición un acuífero es un sistema formado por los sedimentos (arenas, gravas, limos) y el agua, que se almacena llenando los poros. Los acuíferos tienen la capacidad de recibir, almacenar y transportar agua, por lo que sus poros deben estar interconectados permitiendo que el agua fluya a través de ellos, aunque muy lentamente. A mayor conexión entre dichos poros, mayor será la permeabilidad y el acuífero tendrá más posibilidades de ceder agua. Las velocidades de circulación del agua son muy bajas (milímetros o centímetros en el año) y el flujo en el acuífero se produce en general desde un área más alta (zona de recarga) hacia un área más baja (zona de descarga) donde afloran a la superficie, formando manantiales o aportando agua a arroyos, lagos, ríos, etc. (Blarasin y Cabrera, 2005).

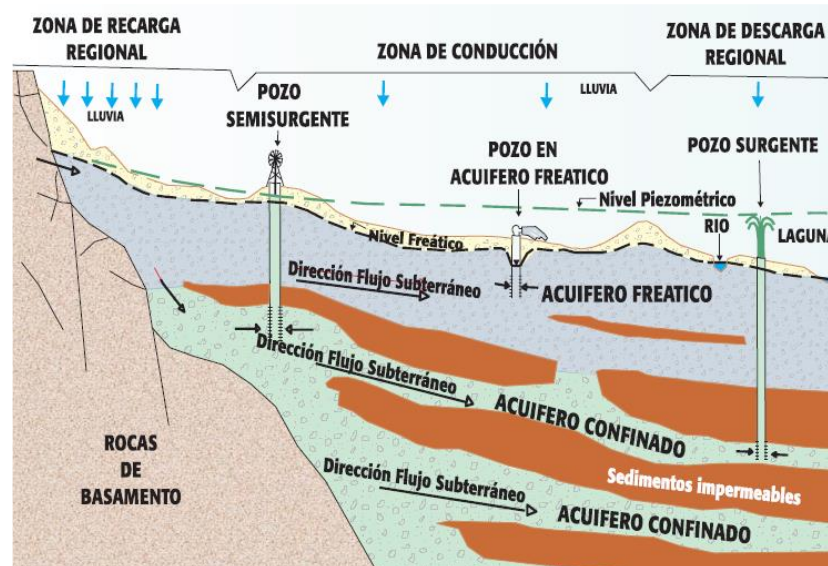
Un acuífero se recarga principalmente por el infiltrado de las lluvias pero también puede recargarse por acción humana (pozos negros, efluentes, etc.) y, al superar la capacidad de almacenamiento de los suelos, circulan hacia la profundidad aumentando las reservas subterráneas. El agua subterránea no tiene la misma calidad en todas sus partes, aunque pertenezca al mismo acuífero, sino que va evolucionando en espacio y tiempo, por lo que al perforar en distintos sitios pueden encontrarse distintas características del agua (Blarasin y Cabrera, 2005).

### 1.2.2. Tipos de acuíferos: libres y confinados

Los *acuíferos libres o freáticos* son cercanos a la superficie y el agua se mueve por la fuerza de la gravedad. Su base es una capa de material impermeable (arcilla, rocas) y puede ubicarse a distinta profundidad. Su nivel superior es el freático (altura que alcanza el agua en el acuífero), que se encuentra sometido a la presión atmosférica y asciende en función de la infiltración de lluvias o desciende por extracción de agua por bombeo (Figura 2) (Blarasin y Cabrera, 2005; Díaz Delgado *et al.*, 2005).

Los *acuíferos confinados o cautivos* están a mayor profundidad y están cubiertos por importantes espesores de sedimento, produciendo que el agua esté a mayor presión que la atmosférica. En este tipo de acuíferos la base y el techo (capas confinantes) son sedimentos de gran espesor, casi impermeables (arcillas). Pueden recargarse por infiltración de agua de lluvia en áreas alejadas, en donde se comportan como acuíferos freáticos (Figura 2). Un caso especial de los acuíferos confinados es aquel en que, si los

materiales del techo son semipermeables, pueden recibir aporte de acuíferos ubicados por encima denominándose, en este caso, *acuíferos semiconfinados* (Blarasin y Cabrera, 2005; Díaz Delgado *et al.*, 2005).



**Figura 2:** Comportamiento de los distintos tipos de acuíferos (Blarasin y Cabrera, 2005)

### 1.3. Contaminación del agua y sus problemáticas

Argentina está ubicada en el extremo de América del sur, con grandes masas montañosas y extensas llanuras de clima templado. Dos tercios del territorio es árido y allí la principal fuente de agua es la subterránea. Un 70,5% del agua del país se emplea en el riego de los distintos cultivos, en especial en esas zonas (Calcagno *et al.*, 2000).

Las fuentes de agua tanto superficiales como subterráneas se ven amenazadas por la contaminación producida por los desechos no tratados, las descargas industriales y las escorrentías de los campos. Solo el 10% de los efluentes domésticos son tratados, mientras que el resto se vierte sin depurar a ríos y lagos (Calcagno *et al.*, 2000; OMS y UNICEF, 2017; MSAL, 2018).

El agua dulce representa apenas un 3% del agua en todo el planeta y en gran parte no es fácilmente accesible. Usualmente para el abastecimiento de agua potable se utilizan las aguas subterráneas y superficiales. El 95% del agua dulce al que se tiene un acceso viable se encuentra en acuíferos, mientras que solo el 5% se encuentra en la superficie. Si

bien el agua superficial es más vulnerable a la contaminación, esto no significa que la subterránea esté exenta (Blarasin y Cabrera, 2005).

La contaminación del agua se produce cuando se introducen sustancias químicas u organismos potencialmente patógenos que pueden volver inadecuada su calidad para el consumo. Ésta puede tener diversos orígenes, siendo los más importantes (Blarasin y Cabrera, 2005):

- Agropecuario: se produce por la descarga de efluentes procedentes de actividades ganaderas, tambos, corrales de aves, depósitos de agroquímicos, etc.
- Urbano y Domiciliario: cuando las aguas residuales domésticas se descargan o se infiltran al subsuelo, sin poseer sistemas de cloacas, con sistemas de saneamiento *in situ* (pozos negros). También puede contaminarse por infiltración de aguas residuales procedentes de la lixiviación de basuras domésticas en vertederos a cielo abierto y por rellenos sanitarios. Otras formas de contaminación urbana se producen por las fugas en el sistema cloacal y por la presencia de cementerios.
- Industrial: producida por la descarga de los efluentes con concentraciones elevadas de compuestos orgánicos e inorgánicos peligrosos. Estos efluentes se descargan en distintos lugares (ríos, lagos, médanos), sin un tratamiento adecuado y suficiente. Las industrias también pueden producir contaminación debido a fugas de tanques y tuberías.

Muchos contaminantes químicos tienen un origen exclusivamente antropológico, como son los pesticidas (por ejemplo: dicloro difenil tricloroetano (DDT), neonicotinoides, carbamatos, carbaril, organofosfatos, clorpirifós, paratión), herbicidas (glifosato, diquat y paraquat), químicos industriales (bifenilos policlorados y plásticos) y compuestos derivados de la producción de energía (hidrocarburos como aceites y petróleo, materiales radioactivos como tritio, uranio y torio). Mientras que otros, si bien se encuentran naturalmente en el agua, pueden considerarse contaminantes si sus concentraciones son elevadas. En muchos casos, el aumento de dichos compuestos químicos es producido por desechos industriales, como por ejemplo arsénico (As), en la producción de vidrio y electrónicos; cadmio (Cd), proveniente de refinerías de metal, baterías y pinturas; flúor (F), de fábricas de aluminio; cobre (Cu), originado por la

corrosión de tuberías; cromo (Cr), que se utiliza en la industria metalúrgica y nitrógeno y fosfato, que se utilizan como fertilizantes (Schweitzer y Noblet, 2018).

Con respecto a los contaminantes biológicos, estos pueden ser bacterias, virus, hongos y protozoos. Las bacterias contaminantes predominantes son las de origen entérico que se encuentran en la materia fecal, como por ejemplo *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, entre otras. Con respecto a los virus se puede mencionar al virus de la hepatitis A, enterovirus y rotavirus. De los protozoos, los más comunes son *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium*. La tabla 2 describe los microorganismos patógenos, contaminantes del agua, que se han identificado en enfermedades hídricas (Moe, 2007; Schweitzer y Noblet, 2018). El agua contaminada puede producir diarrea, cólera, disentería, fiebre tifoidea y poliomielitis (OMS y UNICEF, 2017).

**Tabla 2:** Microorganismos patógenos transmitidos por agua

Patógeno	Fuente	Periodo de incubación	Duración	Síntomas clínicos
<b>Bacterias</b>				
<i>Salmonella typhi</i>	Heces, orina	7-28 días	5-7 días (semanas-meses)	Fiebre, tos, náuseas, dolor de cabeza, vómitos, diarrea
<i>Salmonella</i> spp.	Heces	8-48 horas	3-5 días	Diarrea acuosa con sangre
<i>Shigella</i> spp.	Heces	1-7 días	4-7 días	Disentería (diarrea con sangre), fiebre alta, síntomas tóxicos, retorcijones, pujos intensos e incluso convulsiones
<i>Vibrio cholerae</i>	Heces	9-72 horas	3-4 días	Diarrea acuosa, vómitos, deshidratación
<i>Vibrio cholerae</i> No-O1	Heces	3-5 días	1-4 días	Diarrea acuosa
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Heces	3-9 días	1-9 días	Diarrea acuosa con sangre y moco, dolor abdominal agudo, vómitos, sin fiebre
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Heces	8-24 horas	1-2 semanas	Diarrea, fiebre, cefalea, mialgias, dolor abdominal, heces a veces mucosas y con sangre
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Heces	5-48 horas	3-19 días	Dolores abdominales, diarrea acuosa, fiebre con escalofríos, náuseas, mialgias
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Heces, orina	1-11 días (24-48 horas)	7-10 días	Dolor abdominal, diarrea con moco, sangre, fiebre, vómitos
<i>Campylobacter jejuni</i>	Heces	2-5 días (42-72 horas)	7-10 días	Diarrea, dolores abdominales, fiebre y algunas veces heces con sangre, dolor de cabeza
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Heces	20-24 horas	1-2 días	Fiebre, escalofríos, dolor abdominal, náuseas, diarrea o vómitos
<i>Aeromonas</i> sp.	Heces	Desconocido	1-7 días	Diarrea, dolor abdominal, náuseas, dolor de cabeza y colitis, heces acuosas no sanguinolentas
<b>Virus</b>				
Enterovirus (Poliovirus 1, 2, 3, Coxsackie A y B, Echovirus)	Heces	3-14 días (5-10 días)	Variable	Gastrointestinales (vómitos, diarrea, dolor abdominal y hepatitis), encefalitis, enfermedades respiratorias, meningitis, hiperangina, conjuntivitis
Astrovirus	Heces	1-4 días	2-3 días	Náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, fiebre
Virus de la Hepatitis A (VHA)	Heces	15-50 días (25-30 días)	1-2 semanas, hasta meses	Cansancio, debilidad muscular, síntomas gastrointestinales o síntomas parecidos a la gripe, los síntomas más llamativos son la ictericia (cambio que se produce en el color de los ojos y la piel hacia un tono amarillo, a veces intenso), heces pálidas y coloración intensa en la orina. A diferencia de los adultos, en niños se presentan signos más atípicos y síntomas gastrointestinales
Virus de la Hepatitis E	Heces	15-65 días	Similar a lo	Similar a lo descrito para VHA



(VHE)		(35-40 días)	descripto para VHA	
<b>Rotavirus (grupo A)</b>	Heces	1-3 días	5-7 días	Gastroenteritis con náuseas y vómitos
<b>Rotavirus (grupo B)</b>	Heces	2-3 días	1-3 días	Gastroenteritis
<b>Calicivirus</b>	Heces	1-3 días	1-3 días	Gastroenteritis
<b>Virus Norwalk-like</b>	Heces	1-2 días	1-4 días	Diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal
Parásitos				
<i>Giardia lamblia</i>	Heces	5-25 días	Meses	Puede ser asintomática (hasta un 50%) o provocar una diarrea leve. También puede ser responsable de diarreas crónicas con mala absorción y distensión abdominal
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Heces	1-2 semanas	4- 21 días	Provoca diarrea acuosa, con dolor abdominal y pérdida de peso. Es un cuadro grave en un huésped comprometido y una infección oportunista en otros pacientes
<i>Entamoeba histolitica/ Amebiasis</i>	Heces	2-4 semanas	Semanas-meses	Dolor abdominal, estreñimiento, diarrea con moco y sangre
<i>Cyclospora var. cayetanensis</i>	Heces (ooquistes)	Heces (ooquistes)	Semanas-meses	Diarrea acuosa con frecuentes deposiciones, náuseas, anorexia, dolor abdominal, fatiga, pérdida de peso, dolores musculares, meteorismo y escasa fiebre
<i>Balantidium coli</i>	Heces	Desconocido	Desconocido	Dolor abdominal, diarrea con moco y sangre, pujo y tenesmo
<i>Dracunculus medinensis</i>	Larva	8-14 meses	Meses	El parasito eventualmente emerge (del pie en el 90% de los casos), causando edema intenso y doloroso al igual que ulcera. La perforación de la piel se ve acompañada de fiebre, náuseas y vómitos

Moe, 2007.

La contaminación del agua es un riesgo para los habitantes ya que puede producir diferentes patologías. La gastroenteritis es la más común y su gravedad varía en función del microorganismo, la intensidad, la edad y el estado inmunológico, pudiendo ocasionar una deshidratación mortal. Se producen aproximadamente 500.000 muertes por diarrea al año a nivel mundial originadas por el consumo de agua contaminada, y este problema se encuentra tanto en zonas rurales y urbanas como en las zonas marginales de las grandes ciudades (Calcagno *et al.*, 2000; Moe, 2007; OMS y UNICEF, 2017).

### 1.3.1. Importancia de la contaminación de origen agropecuaria

Las bacterias de origen fecal pueden estar presentes en ambientes acuáticos no solo por el vertido de agua residual, sino que también en áreas rurales el agua puede contaminarse a través de la superficie y la escorrentía del suelo. En muchos casos se utilizan desechos agropecuarios como abono y, al aplicarlos en la tierra, este es movilizado favoreciendo la contaminación que puede llegar a distintas fuentes de agua como ríos, lagos y estuarios. Estas aguas pueden ser utilizadas para beber, riego o para realizar actividades recreacionales, poniendo en riesgo la salud pública (Maal-Bared *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Sidrach-Cardona *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016; Osińska *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017).

Como los antibióticos son ampliamente utilizados en la agricultura, los desechos de los animales de producción pueden contener bacterias resistentes. Los ecosistemas

acuáticos son un ambiente ideal para la diseminación de estas cepas ya que conectan sus mayores reservorios (tierra, humanos y animales) y, debido a esto, siempre están expuestas a cambios ambientales antropológicos como la contaminación de fuentes urbanas, agrícolas e industriales (Maal-Bared *et al.*, 2013; Sidrach-Cardona *et al.*, 2014; Osińska *et al.*, 2017; Egervarn *et al.*, 2017). El ingreso de genes portadores de resistencia a antibióticos en ecosistemas acuáticos podría incrementar los riesgos a la salud pública ya que generalmente se encuentran en elementos móviles transferibles entre bacterias patógenas o no patógenas. Esto tiene, además, un impacto ecológico en las dinámicas de población e interacciones entre comunidades bacterianas (Maal-Bared *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016; Gambero *et al.*, 2018).

#### 1.4. Calidad de agua

Según la definición del Código Alimentario Argentino (CAA) (Art. 982), “con las denominaciones de agua potable de suministro público y agua potable de uso domiciliario, se entiende la que es apta para la alimentación y uso doméstico: no deberá contener sustancias o cuerpos extraños de origen biológico, orgánico, inorgánico o radioactivo en tenores tales que la hagan peligrosa para la salud. Deberá presentar sabor agradable y ser prácticamente incolora, inodora, límpida y transparente. El agua potable de uso domiciliario es el agua proveniente de un suministro público, de un pozo o de otra fuente, ubicada en los reservorios o depósitos domiciliarios”.

El suministro de agua potable debe cumplir con los requisitos de la norma vigente para asegurar su calidad y su seguridad. En Argentina, dicha norma está dispuesta en el Art. 982 del CAA (CAA, 2012), donde se detallan los límites permitidos para los parámetros físicos, químicos y microbiológicos.

##### 1.4.1. Calidad bacteriológica

La presencia de microorganismos no significa necesariamente un peligro para la salud. Ciertos microorganismos en el agua se utilizan como indicadores de una posible contaminación y como índice de su calidad. En el análisis de agua lo ideal sería buscar la presencia de cada uno de los patógenos posibles para asegurar su inocuidad, pero esto resulta poco práctico ya que las técnicas para detectar patógenos específicos son complejas, consumen mucho tiempo, son caras, requieren técnicas de detección muy específicas, como así también operarios bien entrenados y no aseguran completamente

que el agua sea segura para el consumo, por lo que esta práctica no resulta viable para todos los laboratorios (Moe, 2007; OMS, 2006; Okeke *et al.*, 2011). Además, en ambientes acuáticos los microorganismos patógenos son más difíciles de detectar debido a que están en menor número, ya que su concentración depende de la cantidad de enfermos y del nivel de excreción del patógeno, mientras que otros microorganismos son excretados en mayor cantidad por todos los individuos, por lo que sus concentraciones tienden a ser más altas y constantes. Estos microorganismos que pueden estar asociados a patógenos, pueden ser detectados a través de técnicas más sencillas y son llamados “indicadores e índices”, los cuales son utilizados para determinar la seguridad del agua ya que, aunque estos microorganismos no produzcan enfermedades, su detección en el agua indica la presencia de posibles agentes patógenos (Moe, 2007; OMS, 2006; Okeke *et al.*, 2011).

Los indicadores e índices tienen una persistencia en el agua similar a la de los patógenos fecales, pero se encuentran en mayor concentración, responden de forma similar a los tratamientos de potabilización y son detectados mediante técnicas sencillas y baratas (Moe, 2007; OMS, 2006; Okeke *et al.*, 2011). El CAA establece la búsqueda de los siguientes indicadores microbiológicos: microorganismos aerobios mesófilos viables totales, bacterias coliformes totales, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 3), para la evaluación de la calidad de agua para consumo humano.

**Tabla 3:** Indicadores microbiológicos y límites establecidos por el CAA

Indicadores	Límites establecidos
<b>Microorganismos aerobios mesófilos viables totales</b>	Recuento no mayor a 500 UFC/ml
<b>Bacterias coliformes totales</b>	Recuento igual o menor a 3 NMP/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia en 100 ml

- Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales

Este grupo microbiano contiene un amplio espectro de microorganismos heterótrofos, incluidas bacterias y hongos, basándose en su capacidad de crecer en medios ricos en nutrientes (como el agar Plate Count, APC), sin agentes selectivos ni

sustancias inhibidoras, durante un periodo de incubación de 24-48 h y una temperatura definida entre 30-37°C (OMS, 2006). Indica la calidad microbiológica general y no necesariamente la presencia de un riesgo para el consumidor. Sin embargo, muestras de agua con elevado recuento no deben considerarse seguras para el consumo ya que pueden indicar una potabilización inadecuada, algunos microorganismos no patógenos de este grupo pueden producir enfermedades si se encuentran en elevadas concentraciones y las bacterias patógenas son mesófilas, por lo que su presencia contribuye a los recuentos (Toranzos *et al.*, 2007; OMS, 2006).

Es importante resaltar que este grupo indicador tiene un valor limitado en algunos casos, donde los recuentos elevados son naturales debido a que forman parte de la microflora natural y son abundantes en fuentes de agua bruta, como en el caso de las aguas minerales (OMS, 2006; CAA, 2012).

- Coliformes totales

Las bacterias coliformes incluyen una gran variedad de bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no formadores de esporas, capaces de proliferar en presencia de concentraciones relativamente altas de sales biliares, fermentando la lactosa con producción de gas y ácido o aldehído en 24 a 48 h de incubación a 35-37°C. Tradicionalmente se consideraba que las bacterias coliformes pertenecían a los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, pero el grupo es más heterogéneo e incluye a otros géneros como *Serratia* y *Hafnia*. Este grupo bacteriano incluye especies fecales y ambientales (Toranzos *et al.*, 2007; OMS, 2006; Okeke *et al.*, 2011).

Las bacterias pertenecientes al grupo de coliformes totales (excluida *E. coli*) están presentes tanto en aguas residuales como en aguas naturales. Algunas bacterias se excretan en las heces de personas y animales, pero muchos coliformes son heterótrofos y son capaces de multiplicarse en suelos y medios acuáticos. Es decir que pueden sobrevivir y proliferar en sistemas de distribución de agua, sobre todo en presencia de biopelículas. Por consiguiente, no son útiles como índice de agentes patógenos fecales pero pueden utilizarse como indicadores de la eficacia de tratamientos, para evaluar la limpieza e integridad de los sistemas de distribución y analizar la posible presencia de biopelículas (OMS, 2006).

- Coliformes termotolerantes (fecales)

Es un subgrupo funcional de los coliformes totales que además de cumplir con los criterios de ese grupo, son capaces de crecer y fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a una temperatura de 44-45°C. El microorganismo más predominante de este grupo es *E. coli*, pero también incluye a los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Tienen una gran correlación positiva con la contaminación fecal proveniente de animales de sangre caliente debido a que poseen una adaptación termotolerante en sus proteínas y una mayor estabilidad a la temperatura encontrada en el tracto gastrointestinal de animales, la cual es más constante y elevada que las temperaturas de la mayoría de los ambientes acuáticos y terrestres (Toranzos *et al.*, 2007; OMS, 2006).

- *Escherichia coli*

Este microorganismo pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, fermenta la glucosa, reduce los nitratos a nitritos y es oxidasa negativa. Forma parte del grupo de los coliformes totales y coliformes termotolerantes. Es microbiota normal del tracto gastrointestinal de humanos y de numerosos animales de sangre caliente, constituyendo el microorganismo más abundante. Cuando las cepas que son comensales se introducen en algún otro lugar del cuerpo como el tracto urinario o el peritoneo y se dan las condiciones para su desarrollo, se produce una infección como en el caso de las infecciones urinarias y la peritonitis. Aunque la mayoría de las cepas son saprofitas y solo producen infecciones en inmunodeprimidos, *E. coli* puede poseer factores de virulencia que no están presentes en todas las cepas, los cuales les permiten causar desde infecciones urinarias hasta enfermedades muy graves como el síndrome urémico hemolítico. Estos genes de virulencia producen varios síntomas clínicos en un amplio rango de huéspedes, incluyendo a los humanos (Pérez Trallero *et al.*, 2003; OMS, 2006; Pereira *et al.*, 2013).

Al igual que todas las enterobacterias, así como casi todas las demás bacterias Gram negativas, *E. coli* posee lipopolisacárido en la pared celular, el cual actúa como una endotoxina que se libera durante la fase de crecimiento bacteriano o después de su destrucción por las defensas del huésped. La liberación de esta endotoxina desencadena una serie de reacciones generales que dan lugar al shock séptico en algunas infecciones causadas por este tipo de bacterias (Pérez Trallero *et al.*, 2003).

Las infecciones más importantes causadas por *E. coli* descritas por diversos autores (Pérez Trallero *et al.*, 2003; Kyaw *et al.*, 2003; OMS 2006; Moe, 2007; Osínska *et al.*, 2017) son las siguientes:

- Infecciones urinarias: *E. coli* es la causa más frecuente de este tipo de infección, donde produce cistitis y puede evolucionar a pielonefritis o incluso producir una septicemia.
- Infecciones intestinales: diferentes tipos de *E. coli* causan distintas patologías. Los tipos que pueden producir infecciones intestinales son *E. coli* enteropatógena (EPEC); enterohemorrágica (EHEC), donde se encuentran las productoras de toxina tipo Shiga (STEC), causantes del Síndrome Urémico Hemolítico (una enfermedad muy grave que provoca fallo renal y causa brotes); enterotoxigénica (ETEC), que segregan enterotoxinas análogas a las de *Vibrio cholerae* pudiendo ocasionar un cuadro semejante al cólera pero habitualmente de mucha menor intensidad; enteroagregativa (EAEC) y enteroinvasiva (EIEC), que causan una gastroenteritis semejante a la producida por *Shigella* spp. Además, *E. coli* de adhesión difusa (DAEC), con un mecanismo de patogenia desconocido, que carece de los factores de virulencia característicos de los otros patotipos, pero que posee adhesinas que generan un patrón difuso al infectar cultivos celulares.
- Infecciones intra-abdominales: los abscesos y la peritonitis se producen cuando los microorganismos del contenido intestinal salen y contaminan sitios normalmente estériles del organismo por una perforación espontánea o accidental del intestino o una contaminación durante una cirugía. Suelen ser infecciones polimicrobianas en las que *E. coli* se encuentra junto a otras enterobacterias y microorganismos anaerobios.
- Infecciones hospitalarias: la bacteria coloniza el tracto respiratorio y la piel de los enfermos, al igual que otras enterobacterias o microorganismos ambientales. Esta colonización puede ser el origen de neumonías, por la aspiración de secreciones respiratorias contaminadas, infecciones de heridas quirúrgicas, etc. En algunos casos, desde un foco de infección puede pasar a la sangre, donde origina bacteriemia y sepsis.
- Bacteriemias: *E. coli* es uno de los microorganismos que con mayor frecuencia se aísla de hemocultivos, sobre todo en enfermos con infección nosocomial. Estas

bacterias pueden dar lugar a sepsis y, en último extremo, a un shock séptico desencadenado por la acción tóxica de la endotoxina o lipopolisacárido capsular.

La verificación de la calidad microbiológica del agua de consumo incluye el análisis de *E. coli* como indicador de contaminación fecal. Esta bacteria es un indicador más específico que los coliformes termotolerantes (fecales) ya que solo está presente en el tracto gastrointestinal y allí se encuentra en grandes cantidades, alcanzando concentraciones bacterianas en las heces del orden de  $10^9$  bacterias por gramo. Además resulta poco probable su proliferación con la disponibilidad de nutrientes y la temperatura de los ambientes acuáticos. Por estos motivos es un indicador adecuado y es una prueba concluyente de contaminación fecal reciente. Una de las limitaciones que presenta este indicador es que los virus y los protozoos entéricos son más resistentes a la desinfección, por lo tanto la ausencia de *E. coli* no implica necesariamente que no haya presencia de estos organismos (Pérez Trallero *et al.*, 2003; OMS, 2006; Maal-Bared *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Sidrach-Cardona *et al.*, 2014; Osínska *et al.*, 2017).

- *Pseudomonas aeruginosa*

Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, es un bacilo aerobio, Gram negativo, móvil y ubicuo. Está ampliamente distribuido en la naturaleza y puede encontrarse en heces, suelo, plantas, animales, agua y aguas residuales. Puede proliferar en ambientes acuáticos, así como la superficie de materias orgánicas en contacto con el agua. Se caracteriza por la producción de pigmentos tales como pioverdina (de color verde fluorescente) y piocinanina (de color azul verdoso). *Ps. aeruginosa* produce catalasa, oxidasa, amoniaco a partir de arginina y puede utilizar citrato como única fuente de carbono. Crece bien en ambientes acuáticos con muy baja concentración de nutrientes y es capaz de sobrevivir por muchos meses en aguas a temperatura ambiente (Pérez Trallero *et al.*, 2003; OMS, 2006; Prieto, 2012).

Esta bacteria constituye un importante patógeno oportunista, puede colonizar partes dañadas del organismo por lo que es causante de complicaciones graves en personas inmunodeprimidas, con quemaduras severas o con fibrosis quística, donde puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas, septicemia o meningitis. Además, puede producir infecciones de oídos, ojos y piel con el contacto de aguas de recreación contaminadas (Toranzos *et al.*, 2007; Pérez Trallero *et al.*, 2003; OMS, 2006; Prieto, 2012).

Contrario a los otros indicadores, no hay evidencias de que produzca infecciones a través de los usos normales del agua de consumo, sino que es importante porque puede producir cambios en el sabor, olor y turbidez. Este microorganismo tiene la capacidad de adherirse a superficies en ambientes acuáticos formando biofilms que, además de facilitar su establecimiento, presentan multiresistencia a antibióticos y biocidas oxidantes como el cloro, yodo u ozono. Esta característica le otorga mayor resistencia a la desinfección química (ozonización, cloración), por lo que es un buen indicador del proceso de potabilización. Debido a esto, es un microorganismo muy difícil de eliminar o incluso controlar (Pérez Trallero *et al.*, 2003; Prieto, 2012).

## 1.5. Caracterización de *Escherichia coli*

### 1.5.1. Caracterización fenotípica: Resistencia a antibióticos

Los antibióticos son compuestos químicos que se utilizan en medicina para tratar las infecciones bacterianas y, en respuesta a su uso, se produce la resistencia a los mismos. Los microorganismos sufren cambios adaptacionales de forma natural con el tiempo que hacen que los antibióticos dejen de ser eficaces, pero el mal uso y la sobreexposición favorecen a que los cambios genéticos sean más veloces. En consecuencia, esto genera un riesgo para la salud pública debido a que implica la posible falla en el tratamiento de enfermedades (Baynes *et al.*, 2002; Tortora *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009).

Los antibióticos son sustancias con actividad antimicrobiana que en un principio eran de origen biológico pero desde hace más de 20 años la mayoría son sintetizados químicamente (Bergoglio, 1993). Estos tienen varias clasificaciones y se agrupan en base a su función, la cual se relaciona con su estructura principal. A continuación se mencionan las diferentes clasificaciones de los antibióticos y se describen las principales características de cada uno de ellos (Baynes *et al.*, 2002; Tortora *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2009).

- **Betalactámicos:** inhiben la síntesis de la pared celular. Evitan la acción de las enzimas transpeptidasas que son esenciales para la formación de la pared celular bacteriana uniéndose irreversiblemente a las mismas. La estructura común central es un anillo betalactámico y las penicilinas son su grupo más representativo. Ejemplos de este tipo de antibiótico son la ampicilina y la amoxicilina.



Las cefalosporinas son otro subgrupo de betalactámicos que difieren estructuralmente de las penicilinas. Tienen un espectro de acción más amplio y, a veces, son más resistentes a las enzimas que destruyen los anillos betalactámicos, las betalactamasas. Se dividen en generaciones según su descubrimiento y cada generación tiene más eficacia contra bacterias Gram negativas y un espectro de actividad más amplio que el anterior. Al corresponder su descubrimiento con su generación es de esperarse que a mayor generación se encuentre menor resistencia antimicrobiana, pero esto no ocurre debido a la presencia de enzimas con un espectro extendido de acción que dan resistencia a todas las generaciones de cefalosporinas.

- **Inhibidores de betalactamasas:** los mecanismos de resistencia a antibióticos son diversos, como la impermeabilidad al antimicrobiano o la modificación de su sitio de acción, pero el mecanismo más común es la presencia de enzimas que degraden los antibióticos, en este caso las llamadas betalactamasas que destruyen la unidad funcional (el anillo beta lactámico) de este tipo de antibióticos. En este caso cobran importancia los inhibidores de dichas enzimas, el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, compuestos que tienen alta afinidad por las betalactamasas, uniéndose irreversiblemente a ellas e inhibiendo su acción. Por ello es común combinar un antibiótico betalactámico con estos inhibidores de betalactamasas para que logre cumplir su función como antimicrobiano.

- **Análogos de factores de crecimiento:** los factores de crecimiento son sustancias químicas específicas que se requieren en los medios de cultivo porque los microorganismos no son capaces de sintetizarlos. Los análogos de factores de crecimiento actúan bloqueando la utilización de dicho factor. Las sulfonamidas son un ejemplo de estos antimicrobianos ya que actúan inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales mediante una similitud estructural con el precursor del ácido fólico y de los ácidos nucleicos de las bacterias. Son de amplio espectro y pueden combinarse con trimetoprima.

- **Aminoglucósidos:** en su estructura funcional, contienen aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a dos o más aminoazúcares. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas a través de la subunidad 30S del ribosoma. Ejemplos de este tipo de antibióticos son la amikacina y la gentamicina.

- **Tetraciclinas:** inhiben la síntesis de proteínas, interfieren con la subunidad 30S del ribosoma. Su estructura básica consiste en un sistema de 4 anillos unidos en línea. Son los antibióticos que se agregan con mayor frecuencia a los alimentos para animales.

- Quinolonas y fluoroquinolonas: inhiben de modo selectivo la acción de la ADN girasa, que interviene en el plegamiento y enrollamiento del ADN bacteriano durante la replicación celular, es decir que este tipo de antibióticos impiden que la enzima produzca el ADN bacteriano superenrollado, evitando indirectamente la replicación celular. El ácido nalidíxico es la quinolona prototipo y los derivados fluoroquinolónicos del ácido nalidíxico son quinolonas de segunda generación, como es el caso de la ciprofloxacina.

#### 1.5.1.1. El uso de antibióticos en la actividad ganadera

La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) han mostrado especial interés en el preocupante problema de salud pública relacionado con el uso indiscriminado de antibacterianos, el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a estos y su impacto en la salud humana y animal (Hernández-Barrera *et al.*, 2017).

El primer uso de los antibióticos en el ámbito veterinario fue con fines clínicos, es decir, para el tratamiento de enfermedades que afectaban a los animales. Pero luego, se descubrieron otras propiedades y aplicaciones a estas sustancias, como por ejemplo la administración de dosis por debajo de las terapéuticas durante un tiempo prolongado, para la prevención de enfermedades o son utilizados como promotores del crecimiento para el incremento del peso en aves, cerdos y bovinos de corte (Errecalde, 2004; Mulvey *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2016; Osińska *et al.*, 2017; Hernández-Barrera *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). Otros usos son la metafilaxia y profilaxis. La metafilaxia es la administración de antibióticos a un lote completo de animales cuando ocurren variaciones clínicas en los mismos (como aumentos de temperatura), para evitar la aparición de un brote de enfermedad. La profilaxis es similar, ya que se utilizan tratamientos antibióticos en animales individuales o grupos pequeños para prevenir la diseminación de una enfermedad (Errecalde, 2004). Son situaciones tan comunes en la actividad ganadera que, desde hace unos años, solo un 20% de los antibióticos disponibles son utilizados para tratar animales enfermos (Chiesa *et al.*, 2015).

Estas prácticas agropecuarias resultan alarmantes, ya que favorecen la selección de bacterias resistentes las cuales pueden transferir su resistencia genéticamente. El intestino es un ambiente polimicrobiano y tiene una enorme capacidad de transferencia de genes, siendo un reservorio de resistencia de gran magnitud representado por los

microorganismos saprofitos que lo habitan (Errecalde, 2004; Mulvey *et al.*, 2009; ARAE, 2015; Chiesa *et al.*, 2015). Las poblaciones bacterianas seleccionadas por los antimicrobianos pueden, además, afectar a humanos produciendo la transmisión de resistencia desde los animales al hombre (Errecalde, 2004; Mulvey *et al.*, 2009; Egervarn *et al.*, 2017).

*E. coli* es un microorganismo comensal intestinal de humanos y animales, donde tiene la capacidad de adquirir genes de resistencia a antibióticos debido a la presión selectiva producida y a la transferencia horizontal de genes (Maal-Bared *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Osińska *et al.*, 2017). Estas características fenotípicas (perfiles de resistencia a antibióticos) pueden utilizarse para dilucidar el origen de la contaminación, ya que la sola presencia de *E. coli* en el ambiente no da indicios de su origen. Las cepas de origen fecal humano serán más resistentes a antibióticos de uso médico, mientras que aquellas de origen animal serán más resistentes a antibióticos de uso veterinario. *E. coli* es el microorganismo más importante y el más estudiado en la prevalencia de la resistencia a antimicrobianos (Cercenado y Saavedra-Lozano, 2009; Okeke *et al.*, 2011; Gambero *et al.*, 2018).

Diversas metodologías, conocidas como métodos de rastreo microbiano o bacteriano, fueron desarrolladas para distinguir las diversas fuentes de contaminación fecal humana o animal. Estos métodos incluyen la ribotipificación, electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE), los marcadores genéticos ribosomales (ARN 16S), el análisis de secuencias repetitivas de ADN por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (rep-PCR), las fuentes de utilización de carbono y los perfiles de resistencia a antibióticos de bacterias indicadoras fecales. La mayoría de estos métodos se basan en la hipótesis de que características fenotípicas o genotípicas de cepas específicas están asociadas a huéspedes específicos. En función de esto se desarrolla una base de datos de perfiles genéticos o fenotípicos de cepas de fuentes conocidas para predecir el origen de aislados ambientales desconocidos (Ahmed *et al.*, 2005).

Los antibióticos se aplican tanto en medicina humana como animal, pero existen diferencias en el tipo de antimicrobiano que se utiliza y variaciones en la administración de los mismos, por ello los perfiles de resistencia de los microorganismos difieren según su origen. Por lo tanto, la prueba de resistencia a antibióticos es una herramienta útil para dilucidar la fuente de contaminación fecal en ambientes acuáticos (Ahmed *et al.*, 2005;

Cercenado y Saavedra-Lozano, 2009; Okeke *et al.*, 2011; Ibekwe *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Sidrach-Cardona *et al.*, 2014; ARAE, 2015; Gambero *et al.*, 2018). De hecho, el antibiograma es el método fenotípico más comúnmente utilizado, ya que permite analizar grandes cantidades de cepas en poco tiempo y es una metodología económica. Sin embargo, los genes de resistencia pueden perderse o ganarse bajo ciertas condiciones y, además, este método no provee información sobre bacterias indicadoras de contaminación fecal que no son resistentes a antibióticos pero que derivan de diferentes especies animales (Ahmed *et al.*, 2005). Por lo tanto, esta metodología puede utilizarse de manera complementaria a los métodos de caracterización genotípica.

### 1.5.2. Caracterización genotípica

Las técnicas genéticas de rastreo de origen microbiano resultan prometedoras para diferenciar el origen de la contaminación fecal en el agua, ya que analizan las diferencias genéticas específicas de los microorganismos indicadores (Carlos *et al.*, 2012; Gambero *et al.*, 2017b). Estos métodos incluyen las técnicas de PCR basadas en la secuencia de elementos repetitivos (rep-PCR) (Hamilton *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2007; Gourmelon *et al.*, 2007; Carlos *et al.*, 2012).

El método de rep-PCR usa primers para amplificar regiones específicas del genoma bacteriano produciendo patrones genéticos o *fingerprints*. Estos patrones pueden ser generados utilizando secuencias extragenéticas repetitivas palindrómicas (REP), secuencias consenso intergenéticas repetitivas enterobacterianas (ERIC) y los elementos BOX, entre otras. Estas secuencias ocurren naturalmente, son conservadas y están presentes en copias múltiples en los genomas bacterianos, permitiendo la identificación de diversas cepas de *E. coli* (Carlos *et al.*, 2012).

### 1.6. Situación de los recursos hídricos en la provincia de Córdoba

La provincia de Córdoba se ubica en la zona templada de Argentina, con características de una provincia mediterránea. Tiene una gran uniformidad térmica con un periodo de lluvias y un periodo seco. Las precipitaciones tienen valores regionales y son una fuente de entrada de agua para recargar los acuíferos subterráneos. En general, el acuífero libre de la provincia tiene un espesor variable desde los pocos metros en las proximidades de la sierras, hasta 80-100 metros en la llanura. Por debajo de los 80-100

metros de profundidad se ubican acuíferos confinados, con techos y bases de materiales impermeables que les otorgan un confinamiento variable (Blarasin *et al.*, 2014).

Si bien el territorio provincial posee ríos, arroyos y lagos, gran parte del suministro de agua proviene de fuentes subterráneas. El agua subterránea se utiliza en casi todas las actividades humanas como el suministro de agua potable, ganadería, riego e incluso para usos industriales. La actividad que más agua subterránea consume es el riego de cultivos extensivos como la soja, el trigo y el maíz (Blarasin y Cabrera, 2005; Blarasin *et al.*, 2014; Maldonado *et al.*, 2018). Para muchas de estas actividades se utiliza agua subterránea extraída de acuíferos confinados, los cuales poseen mejor calidad, pero tienen posibilidades mínimas de recargarse, por lo que pueden ser propensos a sufrir una sobreexplotación. Si bien las variaciones del nivel del agua subterránea dependen de distintas condiciones, incluyendo las antropológicas, la recarga producida por las lluvias juega un rol importante (Blarasin *et al.*, 2014; Maldonado *et al.*, 2018).

La provincia posee acuíferos libres y confinados que se desarrollan tanto en las sierras como en la llanura y la conexión entre ellos produce que el agua se mueva desde las sierras hacia las zonas deprimidas, presentando una evolución típica de agua dulce a agua salada (Blarasin *et al.*, 2014; Giuliano Albo *et al.*, 2015). Debido a esto, existen problemas de calidad natural y derivados de la contaminación antropológica tanto geoquímicos como microbiológicos, que se han estudiado en las últimas dos décadas en el sur de la provincia (Blarasin *et al.* 2005, Pereyra *et al.*, 2018). Además, los cuerpos de agua superficiales (ríos, lagos y arroyos), reciben efluentes y escurrimientos, que deben evaluarse.

En este marco el área de estudio seleccionada para esta investigación es una continuación del estudio microbiológico realizado de manera interdisciplinaria por los Laboratorios de Geohidrología y de Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

## 2. HIPÓTESIS

Los sistemas hidrológicos (aguas superficiales, acuíferos libres y confinados) presentan distinta vulnerabilidad intrínseca y pueden ser afectados por diferentes fuentes contaminantes, lo que genera diversos hábitats para la proliferación microbiana; la caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* es una buena herramienta para diagnosticar con mayor especificidad origen, ruta y destinos de los contaminantes que afectan a estos sistemas.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo General

Realizar estudios fenotípicos de microorganismos aislados de aguas superficiales y subterráneas y la caracterización molecular de cepas de *E. coli* aisladas en situaciones hidrogeológicas y de uso de territorio contrastantes.

### 3.2. Objetivos Específicos

- 1) Efectuar análisis microbiológico de agua, con la búsqueda de marcadores biológicos de contaminación tales como: recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales, recuento de coliformes totales y termotolerantes (fecales), detección de *Escherichia coli* y de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2) Realizar estudios de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* aisladas e identificadas.
- 3) Establecer posibles asociaciones entre los genotipos de los aislamientos de *E. coli* determinados por técnicas rápidas de amplificación genómica (rep-PCR) y las distintas fuentes que contaminan a los sistemas hídricos.

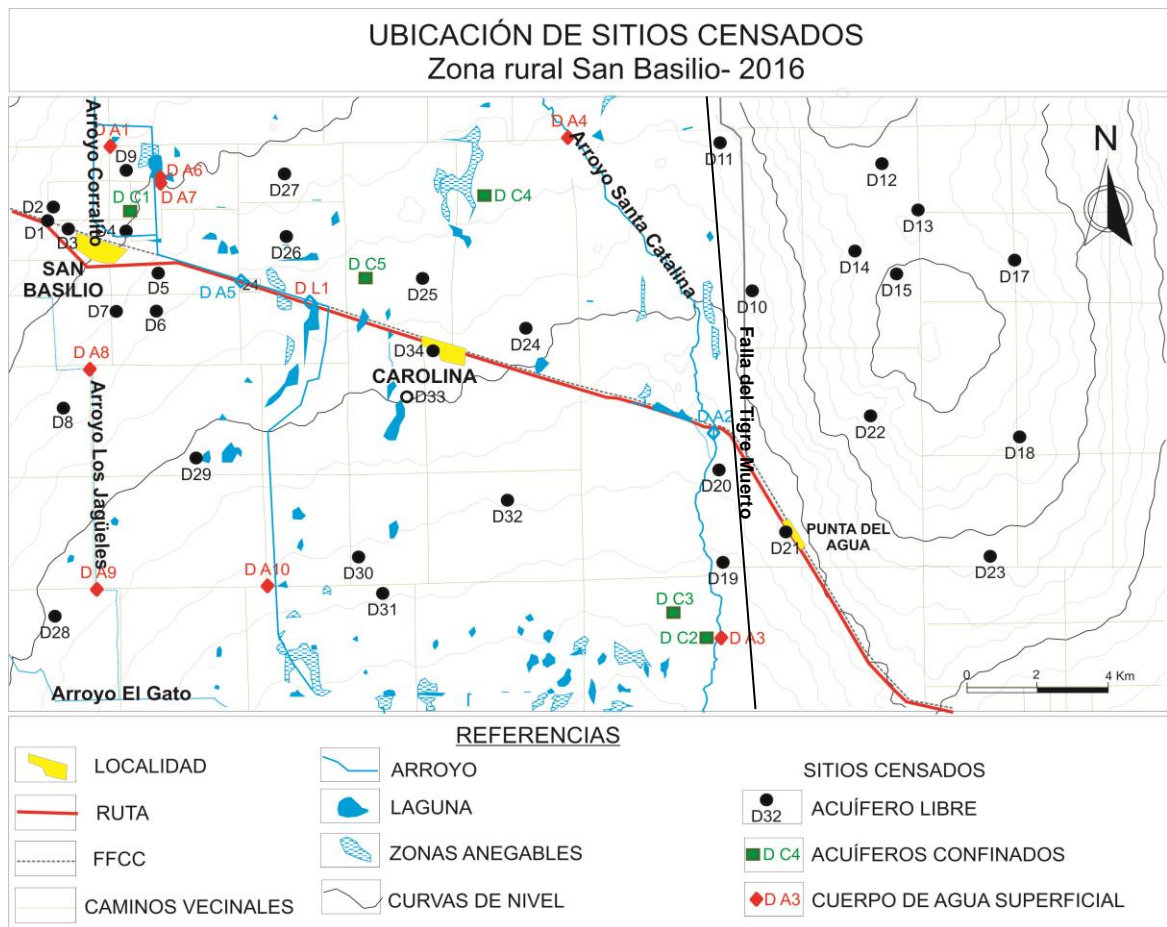
## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado conjuntamente con el grupo de investigación de Geohidrología (Departamento de Geología de la Fac. de Cs. Exactas, Fco.-Qcas. y Naturales, UNRC) quien aportó antecedentes geológicos e hidrológicos del área de estudio seleccionada. Los análisis microbiológicos fueron realizados por la autora de la tesina de grado.

### 4.1. Área de estudio

La zona seleccionada es parte de la llanura chaco-pampeana argentina y se encuentra ubicada al sur de la provincia de Córdoba entre las coordenadas geográficas 33°26' - 33°38' latitud sur y 64°22' - 64°00' longitud oeste. Se trata de 500 km<sup>2</sup> de un área rural con familias que residen en establecimientos rurales, abarcando los parajes Carolina y Punta del Agua, con poblaciones rurales aglomeradas y el centro urbano más importante, la localidad de San Basilio, con 3160 habitantes según datos del censo 2010 del Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina (INDEC) (Figura 3). La principal fuente de agua utilizada es la subterránea, siendo el agua freática la de mayor importancia en zonas rurales debido a sus menores costos de explotación, mientras que los acuíferos semiconfinados y confinados son utilizados para el riego de cultivos y en las zonas urbanas (Cabrera *et al.*, 2012).

El área de estudio es un ámbito geológico muy particular por la presencia de la falla del Tigre Muerto que controla al arroyo Santa Catalina, lo que incide en el relieve



**Figura 3:** Área de estudio y ubicación de los sitios de muestreos

y en la hidrología regional. La falla divide al área de estudio en dos megabloques: el bloque hundido que incluye llanuras, la zona urbana y los arroyos, y el bloque elevado que presenta el aspecto de una gran loma, en donde predomina la agricultura extensiva. Estas características hacen que la zona posea diferentes vulnerabilidades intrínsecas (susceptibilidad del medio) frente a las distintas fuentes de contaminación y, por lo tanto, se ven afectados de manera desigual ante las distintas actividades humanas. Los antecedentes de la región indican que al menos uno de los acuíferos posee aguas termales. El acuífero freático en general es de mala calidad, en algunos casos por la composición química y en numerosas ocasiones por la presencia de microorganismos indicadores, debido al impacto ocasionado por las actividades socio-productivas (Cabrera, 2009; Cabrera *et al.*, 2012; Cabrera *et al.*, 2017).



## 4.2. Etapa inicial

Se seleccionaron los sitios de muestreo en ecosistemas acuáticos superficiales (arroyos y lagunas) y subterráneos (acuíferos freáticos y confinados), especialmente vinculados a distintas situaciones de contaminación (basural, tambos, feed-lots, etc.).

## 4.3. Etapa de campo

Se recaudó información de pobladores del área de estudio sobre el uso de aguas subterráneas (acuíferos confinado y freático) y de aguas superficiales (arroyos y lagunas) y se observaron características del ambiente circundante a las captaciones de agua (presencia de focos potenciales de contaminación, etc.).

### 4.3.1. Recolección de las muestras de agua

Se realizó la extracción de muestras de agua según lo establecido por APHA, AWWA, WEF (2012) en las perforaciones seleccionadas y en el ambiente superficial, para posteriores análisis microbiológicos. Para la toma de muestra a partir de pozos con bombas, molinos y surgentes, se dejó correr inicialmente el agua durante 10 min. Luego se desinfectó la boca de salida del agua más directa de la perforación, flameando con hisopo embebido en alcohol. Se dejó correr nuevamente durante 5 min y se tomaron 500 ml de agua en frascos estériles con tapa hermética, dejando una cámara de aire. Las muestras se identificaron adecuadamente y se conservaron a 7°C hasta llegar al laboratorio de Microbiología de Alimentos del Depto. de Microbiología e Inmunología (UNRC), donde se realizaron las determinaciones dentro de las 24 h post-recolección. Para la toma de muestras de agua superficial, se sumergió un recipiente estéril sosteniéndolo cerca de su base con una mano, con el cuello hacia abajo, hasta 10 cm debajo de la superficie evitando los remansos, la cercanía con las orillas y las zonas excesivamente profundas, y se llenó contracorriente. En caso de ausencia de corriente, se creó una artificialmente empujando el recipiente hacia adelante horizontalmente en una dirección alejada de la mano.

Se tomaron y analizaron 40 muestras, durante la primavera del año 2016, de las cuales 29 fueron obtenidas de fuentes subterráneas (24 de perforaciones ó acuíferos freáticos (D) y 5 de sistemas confinados (DC) y 11 de fuentes superficiales (10 de arroyos (DA) y 1 de laguna (DL).

#### 4.3.2. Descripción del entorno

Se observaron y describieron las posibles fuentes contaminantes que afectaron a las perforaciones censadas mediante la realización de encuestas de actividades de uso de la tierra, uso de agroquímicos, ubicación de los tambos y feed-lots, etc.

#### 4.4. Etapa de laboratorio

##### 4.4.1. Análisis microbiológico de aguas

Se analizaron los parámetros bacteriológicos requeridos por el Código Alimentario Argentino (CAA), además de bacterias coliformes termotolerantes. Por último, se estableció la aptitud de consumo humano según las especificaciones establecidas por dicha normativa. El análisis bacteriológico se llevó a cabo según la metodología establecida por el APHA, AWWA, WEF (2012).

##### 4.4.1.1. Recuento de microorganismos aerobios mesófilas viables totales

Se sembró 1 ml de la muestra sin diluir o de las diluciones decimales que se consideraron convenientes (por duplicado), previamente agitadas, en placas de Petri estériles. Se adicionaron entre 15 y 20 ml del medio de cultivo agar para recuento (APC), fundido y templado a 45-46°C. Se homogeneizó la muestra mediante movimientos rotatorios y rectilíneos y se dejó solidificar el agar en una superficie plana. Las placas se incubaron invertidas en estufa a 30°C durante 24 h. Para el recuento se seleccionaron las placas con un número de colonias comprendido entre 30 y 300. Se expresó el resultado en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra.

##### 4.4.1.2. Recuento de bacterias coliformes totales

Se determinó a través de la técnica de Número Más Probable (NMP) o fermentación en tubos múltiples. Se colocaron 10, 1 y 0,1 ml de la muestra de agua en tubos (por triplicado) conteniendo cada uno de éstos 10 ml de caldo Mac Conkey (donde la fermentación de la lactosa se observa por viraje del indicador de pH púrpura de bromocresol, de violeta a amarillo) con una campana de Durham donde queda atrapado el gas. Estos tubos se incubaron a 35 °C durante 24-48 h. Se utilizó la tabla de probabilidades para determinar el Número Más Probable (NMP) de organismos coliformes totales por 100 ml de agua.

- Prueba Positiva: formación de gas a las 24 h, viraje del indicador de pH.
- Prueba Negativa: sin formación de gas, viraje o no del indicador de pH.

- Prueba dudosa: formación de gas a las 48 h.

#### 4.4.1.3. Recuento de bacterias coliformes termotolerantes (o fecales)

Se tomó un inóculo con ansa a partir de cada tubo positivo de coliformes totales y se sembró en tubos conteniendo 10 ml de caldo Lactosa Bilis Verde brillante al 2% con campana de Durham. Estos últimos fueron incubados a 44,5°C durante 24-48 h. Al igual que para los coliformes totales, el resultado se obtuvo a partir de la tabla de probabilidades para determinar el Número Más Probable (NMP) de organismos coliformes termotolerantes por 100 ml de agua.

- Prueba Positiva: desarrollo microbiano, formación de gas.
- Prueba Negativa: desarrollo o no microbiano, sin formación de gas.

#### 4.4.1.4. Determinación de la presencia o ausencia de *Escherichia coli*

Se adicionaron 100 ml de muestra de agua a 100 ml de caldo Mac Conkey doble concentración y se incubó a 35°C durante 24-48 h. A partir del caldo que presentó turbidez y viraje del indicador de pH se procedió a efectuar el aislamiento por estrías por agotamiento en placas de Petri con agar Levine o EMB (Figura 14, ver Anexo). Las colonias sospechosas de *E. coli* (rojas con centros oscuros que fermentan la lactosa con o sin brillo metálico) fueron confirmadas a través de las pruebas metabólicas I.M.Vi.C. (Producción de Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, utilización de Citrato) (Figuras 15, 16, 17, ver Anexo) y pruebas bioquímicas complementarias: agar Hierro Triple Azúcar (TSI), Fenil Alanina, hidrólisis de Urea, descarboxilación de Lisina (LIA) y fermentación de azúcares (Rafinosa, Manitol y Sorbitol) (Figuras 18, 19, 20 y 21, ver Anexo) según el Manual Bergey de Bacteriología (2017).

#### 4.4.1.5. Determinación de la presencia o ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Se agregaron 100 ml de muestra de agua a 100 ml de caldo Asparagina doble concentración. Se incubó a 35-37°C durante 24-48 h. Si se observó desarrollo de crecimiento bacteriano y fluorescencia (luz UV), se tomó un inóculo con ansa y se sembró por estrías por agotamiento en placas de Petri con agar Cetrimide (Figura 22, ver Anexo). A las colonias sospechosas de *Pseudomonas* sp. (mucosas, con pigmentos y olor frutal) se les realizó la identificación mediante pruebas bioquímicas: Oxidasa, crecimiento a 42°C, producción de pigmentos en agar P para *Pseudomonas* y agar F para *Pseudomonas*.

#### 4.4.2. Perfiles de resistencia a antimicrobianos de *Escherichia coli*

##### 4.4.2.1. Caracterización fenotípica de las cepas de *E. coli* aisladas

Para la identificación de las cepas bacterianas aisladas se realizó, en primer lugar, un screening con las pruebas de I.M.Vi.C. y, en segundo lugar, se realizaron pruebas metabólicas complementarias (ver punto 3.4.1.4). La cepa *E. coli* ATCC 25922 se utilizó como control.

##### 4.4.2.2. Análisis de resistencia a antibióticos

A las cepas bacterianas de *E. coli* aisladas e identificadas de cada una de las muestras de agua superficiales o subterráneas recolectadas, se les realizó la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de difusión en placa descrito por Bauer *et al.* (1966), teniendo en cuenta las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). El ensayo se realizó para conocer el comportamiento de cada una de las cepas frente a 10 antibióticos, los cuales fueron seleccionados en base a su importancia en el tratamiento de infecciones producidas por *E. coli*, tanto en humanos como en animales, y a su uso como aditivo alimentario (promotores del crecimiento en animales) (Tabla 4).

Se sembraron las cepas puras de *E. coli* en 3 ml de Caldo Cerebro Corazón (CCC) contenido en tubos, los cuales fueron incubados a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 18 h (cultivo overnight). Para determinar la cantidad adecuada de inóculo necesario para llevar a cabo la técnica se realizaron dos diluciones ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ), a las cuales se midió la densidad óptica (DO) utilizando un espectrofotómetro con una absorbancia a 625 nm y, además, se comparó de manera visual la turbidez de cada dilución con la del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland. En todos los casos se observó que la dilución  $10^{-2}$  fue la óptima para realizar la técnica ( $\text{DO}_{625} 0,08 - 0,10 = 1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$  para la cepa control *E. coli* ATCC 25922). La suspensión bacteriana se sembró con hisopo en agar Mueller Hinton de 5 mm de grosor contenido en placas de Petri y luego se colocaron los discos comerciales de antibióticos seleccionados. Las placas se incubaron a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h y luego se midió el diámetro (en milímetros) de los halos (zonas claras) de inhibición de crecimiento de cada disco con calibre de precisión. Los tamaños de las zonas de inhibición fueron interpretados con la tabla 4 (CLSI, 2017) y los organismos se

clasificaron como sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado.

**Tabla 4:** Antimicrobianos utilizados en la determinación de susceptibilidad

Antibiótico	Abreviatura	<sup>a</sup> Uso		Concentración del disco (µg)	<sup>b</sup> Punto de corte de zona de difusión (mm)
		Humano	Animal		
Ampicilina	AMP	+	++	10	≤ 13
Tetraciclina	TET	-	++	30	≤ 11
Cefalotina	CEF	++	+	30	≤ 14
Ciprofloxacina	CIP	++	+	5	≤ 15
Ácido Clavulánico	AMC	++	+	10	≤ 13
Amikacina	ANK	++	+	30	≤ 14
Cefoxitina	CTX	++	-	30	≤ 14
Ceftazimida	CAZ	++	-	30	≤ 17
Gentamicina	GEN	++	+	10	≤ 12
Trimetoprima	STX	++	+	1.25	≤ 10

<sup>a</sup>X Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología-SADI (INE-SADI, 2011) (Laplumé *et al.*, 2011); OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal (2015). Uso: - no usado, + poco usado, ++ muy usado.

<sup>b</sup>CLSI, M100-S27, 2017.

#### 4.4.3. Composición de los medios de cultivo

##### Agar Nutritivo

Pluripeptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	8 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,3	

##### Agar Plate Count (PCA)

Tripteína	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1 g

Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7	

**Caldo Asparagina**

DL-Asparagina	3 g
Fosfato de hidrógeno dipotasio anhidro	1 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,5 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,9-7,2	

**Agar Ceftrimida Base**

Peptona de gelatina	20 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10 g
Ceftrimida	0,3 g
Agar	13,6 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,2	

Añadir a un litro de medio de cultivo base, 10 ml de glicerina

**Medio Basal O/F de Azúcares**

Peptona de gelatina	2 g
Tripteína	5 g
Cloruro de sodio	0,3 g
Fosfato dipotásico	0,03 g
Azul de bromotimol	2,5 g
Agar	1000 ml

pH final: 7,1

***Pseudomonas* Agar P**

Peptona de gelatina	20 g
Sulfato de potasio	10 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Glicerina	10 ml
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,2

***Pseudomonas* Agar F**

Tripteína	10 g
Peptona de carne	10 g
Fosfato dipotásico	1,5 g
Sulfato de magnesio	1,5 g
Glicerina	10 ml
Agar	15 g

pH final: 7,2

**Caldo Nutritivo**

Pluripeptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9

**Caldo Lactosa-Bilis-Verde Brillante al 2%**

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Bilis de buey deshidratada	20 g

Verde brillante	0,0133 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,2	

**Caldo Mac Conkey**

Peptona de gelatina	20 g
Lactosa	10 g
Bilis de buey	5 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,3	

**Caldo Cerebro Corazón**

Infusión de cerebro de ternera	200 g
Infusión de corazón vacuno	250 g
Cloruro de sodio	5 g
Peptona	10 g
Fosfato disódico	2,5 g
Glucosa	2 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,4	

**Agar EMB**

Peptona	10 g
Lactosa	5 g
Sacarosa	5 g
Fosfato dipotásico	2 g
Eosina	0,4 g
Azul de Metileno	0,065 g
Agar	13,5 g



Agua destilada 1000 ml  
pH final: 7,2

**Agua de Peptona ara Indol**

Peptona de carne 10 g  
Cloruro de sodio 5 g  
Agua destilada 1000 ml  
pH final: 7

**Medio de Clark y Lubs (RM-VP)**

Peptona 7 g  
Glucosa 5 g  
Fosfato dipotásico 5 g  
Agua destilada 1000 ml  
pH final: 6,7-7,1

**Agar Citrato de Simons**

Sulfato de magnesio 0,2 g  
Fosfato dipotásico 1 g  
Fosfato monobásico 1 g  
Citrato de sodio 2 g  
Cloruro de sodio 5 g  
Azul de bromotimol 0,08 g  
Agar 13 g  
Agua destilada 1000 ml  
pH final: 7,2

**Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)**

Peptona 15 g  
Extracto de levadura 3 g

Extracto de carne	3 g
Proteasa de peptona	5 g
Glucosa	1 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Sulfato de hierro	0,20 g
Cloruro de sodio	5 g
Tiosulfato de sodio	0,3 g
Rojo fenol	0,024 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,2-7,6

#### **Agar Fenil Alanina**

DL-Fenilalanina	2 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato de sodio	1 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,3

#### **Agar Hierro Lisina**

Peptona de gelatina	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
Lisina	10 g
Citrato de hierro y amonio	0,5 g
Tiosulfato de sodio	0,04 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agar	15 g

Agua destilada 1000 ml  
pH final: 6,7

#### **Medio BAM con Urea**

Peptona 20 g  
Urea 10 g  
Lactosa 3 g  
Fucsina ácida 0,037 g  
Azul de timol 0,048g  
Agar 3 g  
Agua destilada 1000 ml  
pH final: 8,3

#### **Agar Mueller Hinton**

Infusión de carne 300 g  
Peptona ácida de caseína 17,5g  
Almidón 1,5g  
Agar 15 g  
Agua destilada 1000 ml  
pH final: 7,2-7,4

#### **4.4.4. Conservación de cepas**

Se sembró un inóculo de cada cepa identificada en CCC (Caldo Cerebro Corazón), el cual se incubó a 35°C durante 24 h. Luego se tomó una alícuota de 800 µl de caldo con crecimiento microbiano y se adicionó a un tubo Eppendorf estéril que contenía 200 µl de glicerol, el cual cumplió la función de crioconservador. Se homogenizó todo el contenido y cada tubo Eppendorf se conservó a -18.

#### 4.4.5. Caracterización molecular de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de agua

##### 4.4.5.1. Metodología de extracción de ADN

A partir de cultivos frescos y puros de las cepas de *E. coli* aisladas de los diferentes sistemas acuáticos de la zona de estudio se realizó la extracción de ADN, según la metodología desarrollada por Borsoi *et al.* (2009), con algunas modificaciones.

Se sembró un inóculo de cada cepa bacteriana en tubos con CCC (Caldo Cerebro Corazón), los cuales se incubaron a 37°C durante 18 h. Finalizado este tiempo, se realizó una siembra en los medios agarizados selectivos y diferenciales: agar EMB y agar Mac Conkey, para verificar la pureza de las cepas. Luego se tomó 1 ml del crecimiento bacteriano y se colocó en un tubo Eppendorf estéril (nuevo y resistente a la temperatura, para evitar su apertura durante el proceso de calentamiento, con la consiguiente contaminación y pérdida por evaporación del ADN) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 min. Se retiró el sobrenadante, dejando el sedimento o pellet lo más seco posible. Después se mezcló el pellet bacteriano resultante con 800 µl de agua bidestilada estéril empleando una micropipeta (aspirando y expulsando el líquido varias veces hasta que el sedimento quedó bien suspendido). Posteriormente se realizó una segunda centrifugación a 12.000 rpm durante 2 min y se volvió a eliminar el sobrenadante. El pellet resultante de esta segunda centrifugación se mezcló nuevamente con la punta de los tips, con 200 µl de agua libre de nucleasas. Esta mezcla fue calentada a 96 - 100°C durante 10 min en un baño termostático. Después de este tratamiento con calor, se realizó una tercera centrifugación a 12.000 rpm por 2 min. Por último, se transfirieron 100 µl de sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y estéril y se conservó en freezer a -18°C hasta su utilización. En esta fracción se encuentra el ADN de la cepa bacteriana.

##### 4.4.5.2. Verificación del método de extracción

La verificación de la efectividad de la técnica de extracción se realizó mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 0,8%. Para ello se pesaron 0,8 g de agarosa y se mezcló en un recipiente con 100 ml de buffer TAE 1X (Tris-Acético-EDTA, pH 8). Se calentó en microondas a baja potencia (con la precaución de no dejar hervir la mezcla, evitando el daño de la agarosa y la formación de una mala textura del gel), durante aproximadamente 4 min para su total disolución. Luego se dejó a

temperatura ambiente hasta alcanzar 55°C, se adicionaron 3 µl de GelGreen (un agente intercalante empleado para teñir y visualizar los ácidos nucleicos, más sensible y menos peligroso que el bromuro de etidio) y se mezcló hasta homogeneizar. Esta mezcla fue vertida en el molde que provee el mismo equipo de electroforesis para realizar el gel y se dejó solidificar durante 30 min. Posteriormente, se transfirió el gel a la cuba electroforética y se adicionó buffer TAE 1X hasta que el gel quedó totalmente cubierto con el mismo.

Luego se procedió a la siembra de cada uno de los ADN en cada calle, para lo cual se mezcló 5 µl del material genético con 5 µl de solución de trabajo de buffer de corrida (2 µl de buffer Blue de corrida 6X + 7 µl de agua bidestilada estéril), por lo cual el volumen sembrado por cada calle fue de 10 µl.

Una vez sembradas todas las muestras se programó una corrida a 100 voltios durante 50 min. Luego de ese período de tiempo, el gel fue retirado de la cuba y visualizado con luz UV (Transiluminador).

#### 4.4.5.3. Reacción de PCR

- Preparación de la reacción de PCR con el primer BOX

Para llevar a cabo la reacción de BOX-PCR se realizó la metodología descrita según Rademaker y Bruijn (1997) con algunas modificaciones (Gambero, 2014). Se preparó la mezcla de reacción con un volumen final de 25 µl según el protocolo de reacción descrito en la tabla 5, el cual indica las concentraciones y los volúmenes de los reactivos para una determinación. Se utilizó el primer BOX 1AR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Biodynamics) para dicha reacción.

**Tabla 5:** Protocolo de reacción de BOX-PCR

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración de trabajo del reactivo</i>	<i>Concentración del reactivo en la mezcla</i>	<i>Vol. del reactivo en la mezcla para una determinación (µl)</i>
<i>Buffer PCR +</i>	5X	1X	5
<i>MgCl<sub>2</sub></i> <i>(Promega)</i>	25 mM	1,5 mM	
<i>dNTPs</i> <i>(Promega)</i>	2,5 mM	0,2 mM	2
<i>Primer-BOX</i> <i>IAR</i>	0,1 nmol/µl	10 pmol/µl	2,5
<i>Taq ADN</i> <i>polimerasa</i> <i>(Promega)</i>	5 U/µl	0,04 U/µl	0,2
<i>ADN templado</i>	Dilución 1/100		3
<i>Agua tri-</i> <i>destilada</i> <i>(Biodynamics)</i>			12,3
<i>Volumen final</i>			25

- **Amplificación**

La etapa de amplificación por PCR se llevó a cabo en un Termociclador MJ Research y se utilizó el siguiente programa: un ciclo a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 40 °C y 2 min a 72 °C. Se finalizó el programa con un paso de extensión a 72 °C por 10 min.

- **Electroforesis para la detección de los productos de amplificación**

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1X a voltaje constante de 40 voltios, por aproximadamente 4 h. Las calles se cargaron con la mezcla de 5 µl de ADN amplificado + 1 µl de buffer Loading 6X. Además, se sembró el marcador de peso molecular Ladder de 100 pb (Promega), utilizado como standard: una mezcla de 1 µl de buffer Loading 6X + 1 µl del marcador de peso molecular + 4 µl de agua tridestilada estéril. Los geles, previamente teñidos con GelGreen, fueron visualizados en un transiluminador UV y fotografiados con un digitalizador de imágenes MiniBisPRO en formato TIFF (*Tagged Image Files Format*) para su posterior análisis.

- **Análisis de los productos de amplificación**

El análisis del perfil genético o *fingerprinting* del ADN por la técnica BOX-PCR de las cepas de *E. coli* estudiadas, utiliza secuencias conservadas repetitivas interdispersas, presentes en varios sitios del genoma de la bacteria (elementos BOX). La amplificación de las distintas regiones genómicas localizadas entre estas secuencias es un método útil en la generación de un único patrón en cada cepa. Así, todas las bacterias de una misma especie asociadas con una fuente común, tienen poca o ninguna diferencia en el número o localización de estos elementos repetitivos. Mientras que aquellas cepas que geográficamente, temporalmente y epidemiológicamente no están relacionadas, es probable que hayan experimentado mutaciones en estos sitios. Por lo tanto, la variabilidad entre organismos no relacionados está dada por el número y localización de estos elementos repetitivos en el genoma (Loeffelholz y Deng, 2006; Mohapatra *et al.*, 2007). Por consiguiente, esta técnica molecular resulta una herramienta útil que pone en evidencia las características genotípicas de una población bacteriana.

Los perfiles genéticos de los aislamientos de *E. coli* fueron comparados mediante inspección visual. La posición de las bandas en cada calle y en cada gel fueron normalizadas usando el marcador molecular 100 pb ADN *ladder* como standard de referencia. Los perfiles genéticos o *fingerprints* fueron colocados en una base de datos y se construyó una matriz binaria de 0 (ausencia) y 1 (presencia) de bandas. La relación entre los perfiles fue estimada mediante la proporción de bandas compartidas aplicando el coeficiente de DICE y se generaron dendrogramas basados en el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages), utilizando el programa NTSYS v. 2.1. (Dombek *et al.*, 2000; Baldy Chudzik y Stosik., 2005; Somarelli *et al.*, 2007).

#### 4.4.5.4. Interpretación de los perfiles genéticos

La interpretación de los patrones de BOX-PCR se realizó según lo sugerido por Malathum *et al.* (1998) y McLellan (2004). Los aislamientos se consideraron idénticos si mostraron patrones de bandeo iguales. Si se observó diferencias de una banda se clasificaron como relacionados en un mismo grupo de clones. Aquellos aislamientos que mostraron diferencias de dos o más bandas se categorizaron como grupos de clones diferentes. En base a esta interpretación realizada, los patrones moleculares fueron agrupados en *clusters* con una similitud superior al 85%.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este estudio se realizó en un área del sur de la provincia de Córdoba que incluye la localidad de San Basilio y los parajes rurales La Carolina y Punta del Agua, como se indicó en el punto 4.1. de Materiales y Métodos.

### 5.1. Análisis bacteriológico de agua subterránea y superficial

Se evaluó la calidad higiénico-sanitaria del agua superficial y subterránea en el área de estudio a partir del estudio de diversos microorganismos indicadores y, en particular, *Escherichia coli* para dilucidar escenarios de contaminación de origen fecal.

#### 5.1.1. Agua subterránea

##### 5.1.1.1. Acuífero freático

En la tabla 6 se muestran los resultados de análisis bacteriológicos determinados en el agua subterránea del acuífero freático.

**Tabla 6:** Resultados de parámetros bacteriológicos determinados en el acuífero freático

Muestras	R.A.T. (UFC/ml)	Coliformes (NMP/100 ml)		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		Totales	Termotolerantes		
<b>Bloque Hundido</b>					
D1	1,5 x 10 <sup>3</sup>	9	9	A	A
D2	2 x 10 <sup>1</sup>	S/D	S/D	A	A
D3	1,3 x 10 <sup>3</sup>	4,3 x 10 <sup>1</sup>	2,3 x 10 <sup>1</sup>	P	A
D4	2,4 x 10 <sup>4</sup>	S/D	S/D	P	A
D5	1 x 10 <sup>2</sup>	1,1 x 10 <sup>3</sup>	S/D	A	A
D6	3,5 x 10 <sup>1</sup>	2,3 x 10 <sup>1</sup>	2,3 x 10 <sup>1</sup>	A	A
D8	5	9	S/D	A	A
D9	1,7 x 10 <sup>2</sup>	4	4	P	A
D24	1,5 x 10 <sup>1</sup>	7	S/D	A	A
D25	2 x 10 <sup>1</sup>	4	S/D	A	A
D27	4,5 x 10 <sup>1</sup>	9	S/D	A	A
D28	2,5 x 10 <sup>2</sup>	2,4 x 10 <sup>2</sup>	2,4 x 10 <sup>2</sup>	P	P
D29	2,2 x 10 <sup>2</sup>	S/D	S/D	A	A



D31	4,8 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>3</sup>	2,3 x 10 <sup>1</sup>	A	A
D32	4,8x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>2</sup>	S/D	A	A
D33	8,8 x 10 <sup>2</sup>	S/D	S/D	A	<b>P</b>
<b>Bloque Elevado</b>					
D10	5,5 x 10 <sup>1</sup>	<b>7</b>	4	<b>P</b>	<b>P</b>
D11	2,3 x 10 <sup>2</sup>	1,1 x 10 <sup>3</sup>	4	<b>P</b>	A
D13	2,7 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>2</sup>	1,5 x 10 <sup>2</sup>	<b>P</b>	A
D15	1 x 10 <sup>2</sup>	S/D	S/D	A	A
D17	2,5	S/D	S/D	A	A
D21	2,5 x 10 <sup>1</sup>	S/D	S/D	A	<b>P</b>
D22	3,4 x 10 <sup>1</sup>	S/D	S/D	A	A
D23	4 x 10 <sup>2</sup>	S/D	S/D	A	A

RAT= Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales; UFC/ml= Unidades Formadoras de Colonias por mililitro; NMP/100 ml= Número Más Probable en 100 ml; A= Ausencia; P= Presencia; S/D= sin desarrollo.

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales varió entre 2,5 (D17) y 4,8 x 10<sup>4</sup> UFC/ml (D31 y D32). En cuanto al recuento de coliformes totales, el 62% de las muestras presentó valores que variaron entre 4 (D9 y D25) y 1,1 x 10<sup>3</sup> NMP/100 ml (D5, D31 y D11). Mientras que, el 37% presentó recuentos de coliformes termotolerantes que variaron entre 4 (D9, D10 y D11) y 2,4 x 10<sup>2</sup> NMP/100 ml (D28). Por otra parte, el 29% (7) de las muestras presentó *E. coli* (D3, D4, D9, D28, D10, D11 y D13) y el 17% (4) *Pseudomonas aeruginosa* (D28, D33, D10 y D21).

La muestra D3, ubicada en ejido urbano (localidad de San Basilio) y la D13, localizada en un área con agricultura como principal actividad y, menor grado, la ganadería (porcina), presentaron altos recuentos de RAT, CT, CTT y presencia de *E. coli*, resultando estas dos muestras las más contaminadas. El sitio D3 está asociado a la presencia de ganado vacuno pero con baja frecuencia (feria de animales, presencia de corrales y bebederos), mientras que en D13 se observó a 50 m aproximadamente un corral de crianza porcina abandonado. Se podría inferir que éstas dos actividades ganaderas serían las posibles fuentes contaminantes (contaminación de tipo puntual) del agua subterránea en ambos sitios de muestreo.

Por otra parte, del total de muestras analizadas solamente seis presentaron buena calidad bacteriológica (D2, D15, D17, D22, D23 y D29). La muestra D2 se encuentra próxima a D3 y las muestras D15 y D17 se encuentran próximas a D13, por lo cual se podría esperar que estas muestras también resultaran impactadas por la contaminación. Sin embargo, la calidad del agua de los acuíferos puede variar de forma muy puntual debido a las distintas variables intrínsecas que definen a su vulnerabilidad, por ejemplo espesor de la zona no saturada, nivel freático, entre otras (Blarasin y Cabrera , 2005; Blarasin *et al.*, 2014; Gambero *et al.*, 2018).

Según se describió en el apartado 4.1. de Materiales y Métodos, la zona de estudio se caracteriza por la presencia de la falla regional del “Tigre Muerto”, a partir de la cual se distinguen dos megabloques: bloque hundido y bloque elevado. Las diferencias en el uso del territorio y a las características hidrogeológicas entre ambas zonas se ven reflejadas en la calidad bacteriológica del agua subterránea. Se observó que solo el 12,5% de las muestras pertenecientes al bloque hundido fueron aptas para el consumo humano según lo establecido por el CAA, mientras que en el bloque elevado el 50% de las muestras resultaron aptas.

En el bloque hundido, el 25% de las muestras presentó *E. coli* (D3, D4, D9, D28) Cabe destacar que en estos sitios de muestreo están asociados principalmente a actividad agrícola y, en menor grado, a la ganadería. En el bloque elevado, se observó la presencia de *E. coli* en el 37,5% de las muestras (D10, D11 y D13). En estos sitios de muestreo, como en el resto del área comprendida en este bloque, la principal actividad es agrícola y, en menor grado, la ganadería (porcina y ovina). Según Kümmerer (2009), la alta incidencia de contaminación microbiana de origen fecal en agua subterránea rural puede deberse a la escorrentía de granjas o a la fuga de tanques sépticos.

#### 5.1.1.2. Acuífero confinado

Los sistemas acuíferos profundos se han estudiado solamente en el bloque hundido, dada la existencia de perforaciones que permiten extraer aguas de mejor calidad que el sistema freático, aspecto que no se visualiza en el bloque elevado.

En la tabla 7 se muestran los resultados de los análisis bacteriológicos de las muestras de agua de acuíferos confinados. Del total de muestras analizadas, solamente una (DC5) resultó la más contaminada y, por lo tanto, no apta para el consumo humano. Se observaron recuentos de coliformes totales y termotolerantes de 4 NMP/100 ml,

como así también presencia de *E. coli*. Este resultado puede deberse a la contaminación de la propia cañería, la cual se observó deteriorada y en malas condiciones, ya que este sitio constituye un abrevadero de ganado vacuno perteneciente a un tambo de gran envergadura. Similares resultados fueron hallados por Prieto (2012) en la zona entre Carnerillo y Ballesteros sur, Córdoba, donde la mayoría de las cañerías de las perforaciones analizadas estaban en malas condiciones sanitarias.



**Figura 4:** Sitio de muestreo DC5.

**Tabla 7:** Resultados de parámetros bacteriológicos del agua de acuíferos confinados

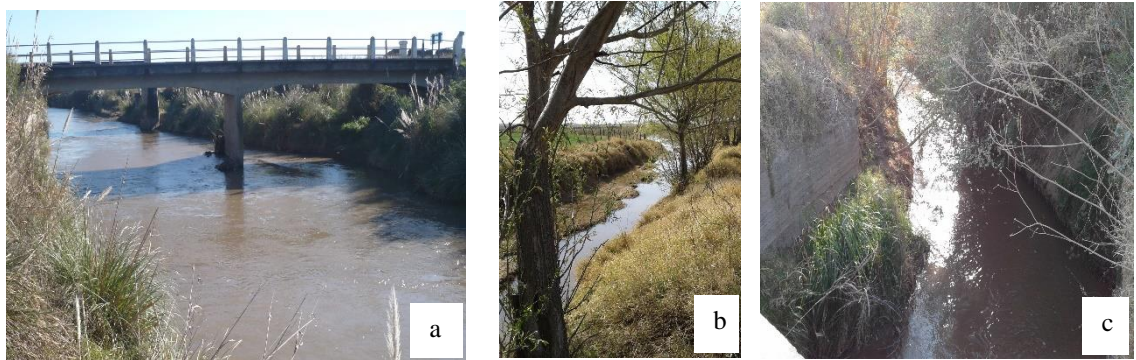
Muestra	R.A.T. (UFC/ml)	Coliformes (NMP/ml)		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		Totales	Termotolerantes		
DC1	5	S/D	S/D	A	A
DC2	6	S/D	S/D	A	A
DC3	3	S/D	S/D	A	A
DC5	1 x 10 <sup>2</sup>	<b>4</b>	4	<b>P</b>	A

RAT= Recuento de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos viables totales; UFC/ml= Unidades Formadoras de Colonias por mililitro; NMP/100 ml= Número Más Probable en 100 ml; A= Ausencia; P= Presencia; S/D= sin desarrollo.

### 5.1.2. Agua superficial

Las muestras de agua de arroyos fueron tomadas principalmente al ingreso y egreso de estos cursos fluviales al área de estudio, con el fin de conocer las variaciones que sufren estos cuerpos de agua en su tránsito por la zona (ver ubicación de los sitios de muestreo en Figura 3).

El arroyo Santa Catalina (Figura 5-a) es el único sistema fluvial con nacientes en áreas serranas. Este arroyo, principalmente en la zona de estudio, recibe el aporte de agua subterránea (régimen permanente), por lo que las crecientes y desbordes más importantes se deben a lluvias de alta intensidad ocurridas tanto en sierras como en la propia llanura. Los arroyos Corralito y Los Jagüeles (Figura 5 b-c), que nacen en plena llanura por afloramiento del agua subterránea en sectores de suelos deprimidos fuera del área estudiada, se encuentran muy antropizados.



**Figura 5:** Arroyos: a) Santa Catalina, b) Corralito y c) Los Jagüeles

En la tabla 8 se muestran los resultados bacteriológicos de las muestras de aguas superficiales de los tres arroyos estudiados.

**Tabla 8:** Resultados de parámetros bacteriológicos de aguas superficiales

Arroyo	Muestra	R.A.T. (UFC/ml)	Coliformes (NMP/100 ml)		<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>
			Totales	Termotolerantes		
Santa Catalina	DA4	$2,2 \times 10^3$	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	A	A
	DA2	$1,6 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	P	A
	DA3	$4 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	A	A
Corralito	DA1	$1 \times 10^3$	9	9	P	A
	DA6	$3,8 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	P	A
	DA7	$3,3 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	P	A
	DA5	$3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	P	A
	DL1	$2,4 \times 10^3$	$9,3 \times 10^1$	$9,3 \times 10^1$	P	A
	DA10	$5 \times 10^4$	$2,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1$	P	A

Los Jagüeles	DA8	$4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	P	A
	DA9	$2,5 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	P	A

RAT= Recuento de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos viables totales; UFC/ml= Unidades Formadoras de Colonias por mililitro; NMP/100 ml= Número Más Probable en 100 ml; A= Ausencia; P= Presencia.

El total de las muestras de agua superficial analizadas mostraron un importante impacto de la contaminación bacteriológica debido a los altos recuentos y presencia de microorganismos indicadores. Si se consideran los parámetros microbiológicos establecidos por el CAA, ninguna de las muestras resultó apta para el consumo humano por superar algunos de los límites establecidos.

En general se observó que estas aguas presentaron recuentos elevados, con valores de aerobios mesófilos viables totales que variaron entre  $1 \times 10^3$  (DA1) y  $5 \times 10^4$  UFC/ml (DA10). Los coliformes totales y termotolerantes se comportaron de manera similar, ya que ambos grupos presentaron valores entre 9 (DA1) y  $1,1 \times 10^3$  NMP/100 ml (DA6, DA5, DA8 y DA9). La mayoría de las muestras (82%) presentaron *E. coli*, pero en ninguna se detectó *P. aeruginosa*. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, así Gambero *et al.* (2018) encontraron recuentos bacterianos similares en el arroyo Knutzen (Córdoba, Argentina). Por otra parte, Pereira *et al.* (2013) observaron que todas las muestras de agua superficial de un estuario en Portugal presentaron recuentos elevados de coliformes y presencia de *E. coli*.

Con respecto a los tres sitios muestreados del arroyo Santa Catalina, el punto DA3 (egreso de la zona de estudio) mostró los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos viables totales y de coliformes totales más altos ( $4 \times 10^3$  UFC/ml y  $4,8 \times 10^2$  NMP/100 ml, respectivamente), mientras que en DA2 (cruce con ex Ruta 24) se observó el recuento máximo de coliformes termotolerantes ( $2,4 \times 10^2$  NMP/100 ml) y la presencia de *E. coli*. Los sitios DA2 y DA3 se encuentran aguas abajo de DA4 (ingreso al área de estudio), por lo que la variación observada en estas tres muestras de agua podría deberse a distinto grado de contaminación puntual (abrevadero de ganado) y posterior dilución de contaminantes debido a la velocidad de circulación del agua de este sistema.

Con respecto a los sitios muestreados a lo largo del arroyo Corralito, en general se observó que los valores de recuento de aerobios mesófilos totales son similares (entre  $1 \times 10^3$  y  $3,8 \times 10^3$  UFC/ml), excepto para la muestra DA10 (egreso de la zona de

estudio) en la que se observa un aumento en una unidad logarítmica de este grupo microbiano ( $5 \times 10^4$  UFC/ml). Con respecto a coliformes totales y termotolerantes, este arroyo presentó la mayor variación de recuentos entre los sitios muestreados (valores entre 9 y  $1,1 \times 10^3$  NMP/100 ml para ambas variables). Además, se detectó *E. coli* en el 100% de las muestras analizadas. Estos resultados indican distinto grado de afectación al agua de este arroyo por procesos de contaminación puntual, posiblemente debido principalmente al abrevadero de ganado. En el caso de DA6 y DA7 se suma la presencia del ex basural municipal, inmediatamente aledaño a los sitios censados. Cabe destacar que este sistema, en el área de estudio, se encuentra canalizado (antropizado) y su caudal es muy pequeño, con sectores con agua estancada y alto contenido de sólidos en suspensión, aspectos que influyen en la escasa dilución de los contaminantes. El sitio DL1, laguna de mayor tamaño dentro del área de estudio, de carácter permanente dividida por la ex ruta 24 y que conecta al arroyo, presentó una calidad microbiológica deficiente, comportándose como las demás muestras del sistema.

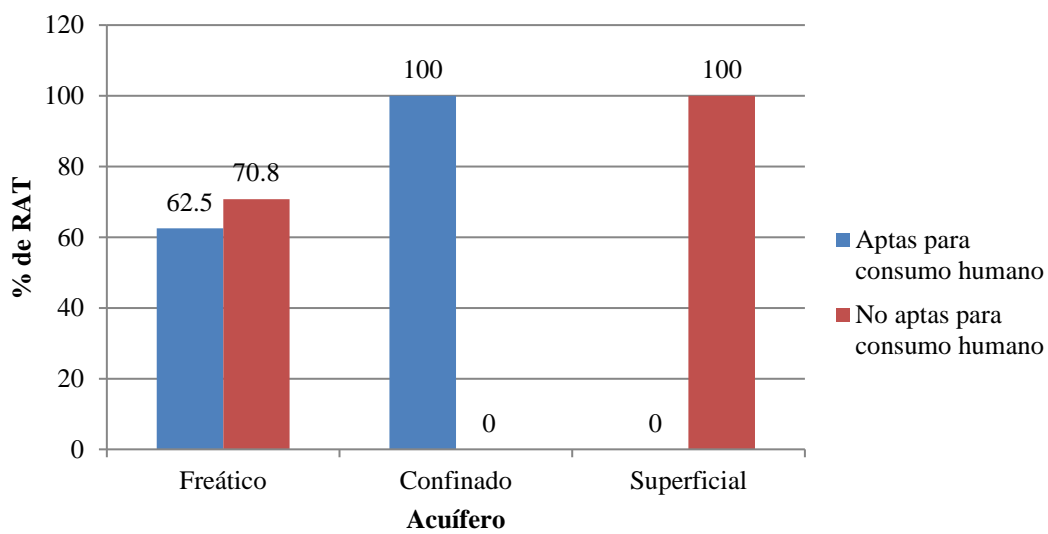
Las muestras analizadas del arroyo Los Jagüeles presentaron resultados similares a pesar de la importante distancia que las separa. Se observaron recuentos de aerobios mesófilos viables totales entre  $2,5 \times 10^3$  y  $4 \times 10^3$  UFC/ml, coliformes totales y termotolerantes de  $1,1 \times 10^3$  NMP/100 ml y presencia de *E. coli*. Esto también puede deberse a procesos de contaminación puntual (llegada de animales al curso de agua).

Al comparar la calidad microbiológica de los tres arroyos muestreados, se observó que el arroyo Santa Catalina, el de mayor caudal, tiene la menor contaminación fecal, con sitios que no presentaron desarrollo de *E. coli*, mientras que el arroyo Corralito, de muy bajo caudal y canalizado, mostró contaminación puntual. El arroyo los Jagüeles, con fuerte control antropológico, es el de mayor contaminación fecal. Esto demuestra que los tres arroyos poseen distintas vulnerabilidades intrínsecas debido a sus diferencias hidrogeológicas y, además, son afectados por las distintas actividades antrópicas realizadas en ellos o en sus cercanías.

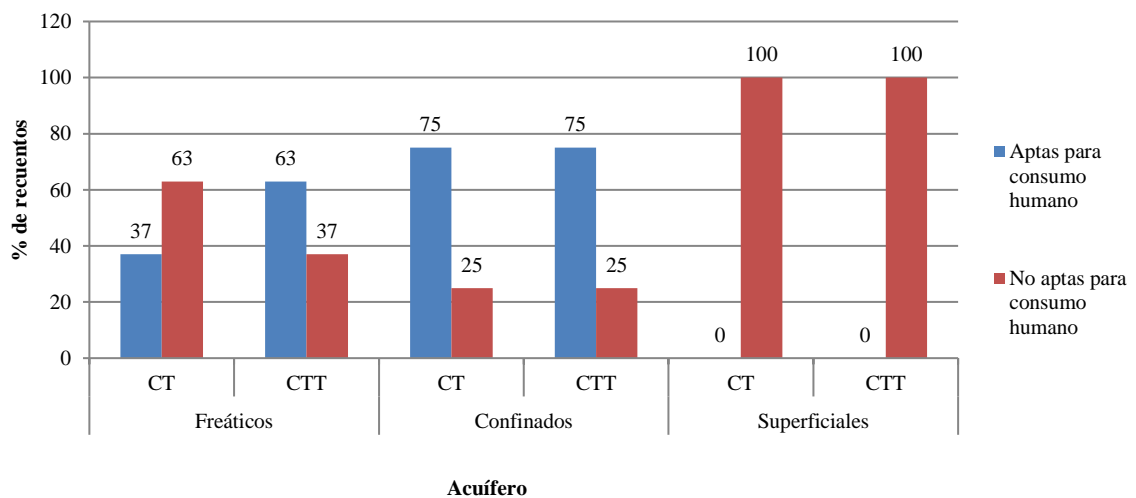
### 5.1.3. Aptitud de consumo humano del total de muestras de agua

En las figuras 6 y 7 se muestran los porcentajes de aptitud de consumo humano del total de muestras de agua pertenecientes a los tres sistemas hidrológicos estudiados (acuíferos freáticos, acuíferos confinados y aguas superficiales) a partir de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos viables totales (RAT), coliformes totales (CT) y

coliformes termotolerantes (CTT). En la figura 6 se observa que el 62,5% de las muestras provenientes de acuíferos freáticos presentó un RAT menor al establecido como límite permitido por el CAA (CAA, 2012), mientras que en los acuíferos confinados este valor fue del 100%. Por el contrario, el total de muestras de agua superficial presentó valores por encima del límite permitido. Con respecto a CT y CTT (figura 7), se observa que el 37% y el 63% de los acuíferos freáticos presentaron bajos valores de recuento, respectivamente, mientras que para confinados este porcentaje fue del 75%. Con respecto a aguas-superficiales, el 100% de las muestras presentó elevados recuentos.



**Figura 6:** Porcentajes de aptitud de consumo humano a partir del recuento de microorganismos de aerobios mesófilos viables totales (RAT) en el total de muestras de agua analizadas



**Figura 7:** Porcentajes de aptitud de consumo humano a partir de recuentos de coliformes totales (CT) y coliformes termotolerantes (CTT) en el total de muestras de agua analizadas

Las muestras de agua tomadas del acuífero confinado fueron las de mejor calidad bacteriológica ya que al estar ubicados a profundidades mayores a los 120 m, se encuentran más protegidas a la contaminación. Mientras que las fuentes de agua superficiales, al estar en contacto con el ambiente, son más vulnerables y por lo tanto la calidad microbiológica es más deficiente. Con respecto al acuífero freático, la profundidad del bloque hundido y del bloque elevado varía significativamente. El primero presenta profundidades cercanas a la superficie (zona no saturada menor a 10 metros) donde el agua aflora en determinados lugares y forma lagunas permanentes, por lo que tiene una mayor vulnerabilidad a la contaminación. Por el contrario, el bloque elevado se encuentra más profundo (zona no saturada mayor a 10 metros), lo que implica que la posibilidad de llegada de contaminantes sea menor ya que estos pueden quedar retenidos o ser degradados en la zona no saturada y no llegar al agua subterránea (menor vulnerabilidad intrínseca a la contaminación).

## 5.2. Resistencia a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli*

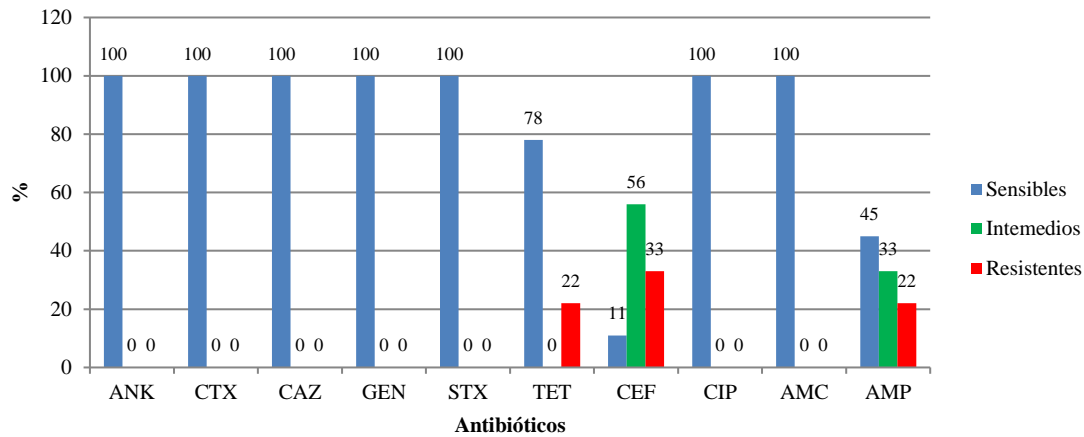
Se realizó la caracterización fenotípica de cada cepa aislada a partir de aguas superficiales y subterráneas (acuíferos freático y confinado). Esta caracterización se llevó a cabo con el fin de tipificar cada uno de los aislamientos y relacionar los perfiles obtenidos con el uso del territorio, de manera de dilucidar las posibles fuentes de contaminación fecal (humano o animal) que afectan al recurso hídrico. Todas las cepas presentaron caracterización bioquímica típica para *E. coli*.

### 5.2.1. Cepas de *E. coli* aisladas de aguas subterráneas

#### 5.2.1.1. Acuífero freático

Un total de 9 cepas de *E. coli* fueron aisladas del acuífero freático. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de susceptibilidad a 10 antibióticos de todas las cepas aisladas.





**Figura 8:** Evaluación de susceptibilidad a antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas del acuífero freático (ANK=Amikacina, CTX=Cefoxitina, CAZ=Ceftazimida, GEN=Gentamicina, STX=Trimetoprima, TET=Tetraciclina, CEF=Cefalotina, CIP=Ciprofloxacino, AMC=Ácido clavulánico, AMP=Ampicilina)

El total de cepas aisladas del acuífero freático fueron sensibles a amikacina (ANK), cefoxitina (CTX), ceftazimida (CAZ), gentamicina (GEN), trimetoprima (STX), ciprofloxacino (CIP) y ácido clavulánico (AMC). El 33% (3) fue resistente a cefalotina (CEF), antibiótico mayormente utilizado en humanos y el 22% (2) a ampicilina (AMP) y tetraciclina (TET), antibióticos de uso común en ganadería. Un 56% (5) de estos aislados presentó valores intermedios para CEF y un 33% (3) para AMP. Una de las dos cepas aisladas del sitio D28 (D28 (1), resultó sensible a todos los antibióticos utilizados. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gambero *et al.* (2017a), donde un alto porcentaje de cepas de *E. coli* aisladas de agua subterránea presentaron resistencia a tetraciclina, cefalotina y ampicilina, con baja frecuencia de multiresistencia.

Alexander *et al.* (2008) determinaron que la sensibilidad a GEN y a CIP puede deberse a la muy baja frecuencia de uso de estos antibióticos en niveles subterapéuticos y a las restricciones regulatorias de fluoroquinolonas. Además, los autores sugieren que la alimentación de animales con otros antibióticos no aumenta la resistencia a GEN, es decir, que no hay resistencia cruzada, coincidiendo con los resultados de este estudio.

Las cepas pertenecientes a los sitios de muestreo D3 y D9 solo presentaron una resistencia intermedia a CEF. Estas perforaciones se ubican dentro del ejido urbano (D3) y en zona rural, alejada de la zona urbana (D9), por lo que se puede inferir que la contaminación fecal podría provenir de trabajadores rurales, en coincidencia con un estudio realizado por Sayah *et al.* (2005), que explica que la presencia de resistencia a

antimicrobianos de uso humano en campos agricultores puede deberse a otras fuentes de origen como los trabajadores rurales. Según Mulvey *et al.* (2009), existen cepas de *E. coli* resistente a cefoxitina (antibiótico de uso humano) presentes en animales en muy baja frecuencia. También puede deberse a la resistencia cruzada, ya que según un estudio realizado por Kümmerer (2009) se demostró que el uso de un agente antimicrobiano puede incrementar la resistencia a otras drogas con mecanismos de acción diferentes.

La cepa D4 (2) aislada de la perforación D4, en zona rural pero cercana al ejido urbano, presentó resistencia a los antibióticos CEF y TET, mientras que la cepa D4 (1) aislada de la misma perforación fue resistente a dos antimicrobianos utilizados en animales (TET y AMP). En este sitio se desarrolla actividad agrícola, pero se encuentra muy influenciado por actividad ganadera intensiva (contaminación puntual) aguas arriba de la perforación, lo que explicaría la presencia de *E. coli*. Estas fueron las únicas cepas que presentaron resistencia a tetraciclina, resultado que difiere al obtenido por un estudio realizado por Unno *et al.* (2010), en el cual se observó que la mayor resistencia de las cepas de *E. coli* fue frente a TET, debido a que es el antimicrobiano más utilizado en medicina veterinaria y puede aplicarse como promotor del crecimiento en animales. Sin embargo, Sayah *et al.* (2005), encontraron que la resistencia a CEF es más frecuente en muestras de agua que la resistencia a TET, lo cual puede deberse a que la resistencia a CEF se produce por mutaciones estables que son fácilmente retenidas por las bacterias, mientras que la resistencia a TET se encuentra en plásmidos y puede perderse fácilmente.

Cabe destacar que las cepas resistentes a TET fueron, además, resistentes a AMP, resultados coincidentes con los obtenidos por Gambero *et al.* (2017a) y Alexander *et al.* (2008), quienes indicaron que la administración de TET en animales puede promover la resistencia a AMP, es decir, que la resistencia a TET podría inducir la resistencia a AMP y que ambas resistencias compartan un elemento genético móvil.

Otras cepas que presentaron resistencia a CEF y AMP fueron D10, D11 y D28 (2). La contaminación del sitio D10 podría provenir de la ganadería porcina, mientras que la de D11 de la actividad ovina y porcina, a pequeña escala. A partir de un estudio realizado por Hamelin *et al.* (2007), pudo demostrarse que los patrones de resistencia son similares entre animales de distinta especie pertenecientes al mismo lugar de

producción, es decir, que aunque una granja posea distintos animales, los perfiles de resistencia señalan a una fuente común de contaminación. Por otro lado, la cepa D28 (2) proviene de un sitio con intensa actividad agropecuaria. Como se describió anteriormente, según Sayah *et al.* (2005), la contaminación de los campos con actividad agrícola puede atribuirse a otras fuentes como trabajadores rurales, animales domésticos (perros, gatos, conejos, etc.) y, en menor grado, por animales silvestres.

#### 5.2.1.2. Acuífero confinado

Con respecto al acuífero confinado, solamente se aisló 1 cepa de *E. coli*. En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de susceptibilidad a 10 antibióticos de la única cepa aislada.

**Tabla 9:** Evaluación de susceptibilidad de una cepa de *E. coli* aislada del acuífero confinado

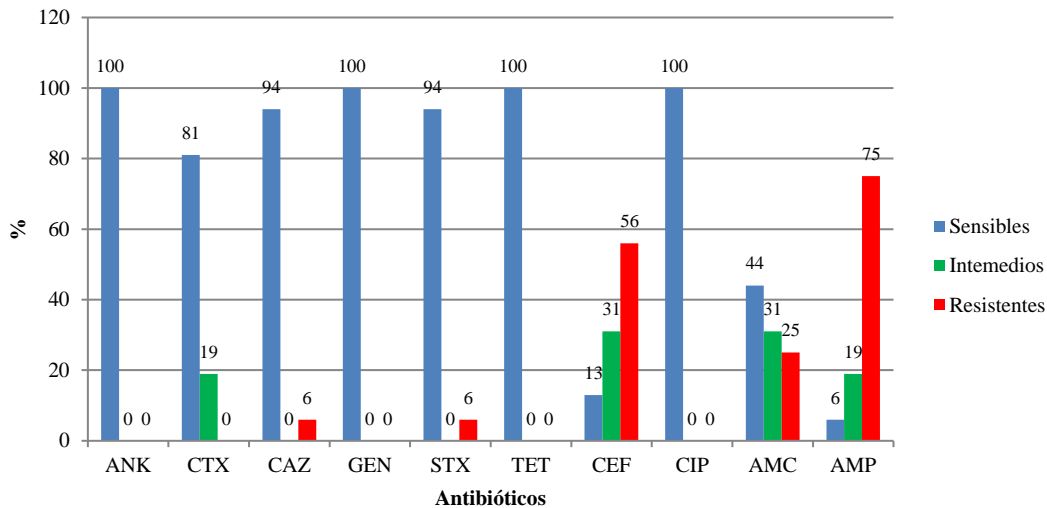
Punto de muestreo	Designación	Antibióticos									
		ANK	CTX	CAZ	GEN	STX	TET	CEF	CIP	AMC	AMP
DC5	DC5	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R

ANK=Amikacina, CTX=Cefoxitina, CAZ=Ceftazimida, GEN=Gentamicina, STX=Trimetroprima, TET=Tetraciclina, CEF=Cefalotina, CIP=Ciprofloxacino, AMC=Ácido clavulánico, AMP=Ampicilina.

La única cepa de *E. coli* aislada de acuíferos confinados (DC5), presentó resistencia a CEF y a AMP. En este sitio la principal actividad es tampera, sin embargo, las características hidráulicas del sistema confinado llevan a interpretar contaminación de la propia cañería y no del agua subterránea procedente del acuífero.

#### 5.2.2. Cepas de *E. coli* aisladas de aguas superficiales

Fueron identificadas 16 cepas de *E. coli* aisladas de aguas superficiales. En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de susceptibilidad a los antibióticos estudiados de estas cepas.



**Figura 9:** Evaluación de susceptibilidad a antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de aguas superficiales (ANK=Amikacina, CTX=Cefoxitina, CAZ=Ceftazimida, GEN=Gentamicina, STX=Trimetoprima, TET=Tetraciclina, CEF=Cefalotina, CIP=Ciprofloxacino, AMC=Ácido clavulánico, AMP=Ampicilina)

El 100% de las cepas aisladas de muestras superficiales fue sensible a ANK, GEN, TET y CIP, mientras que un 75% fue resistente a AMP (12), un 56% (9) a CEF, un 25% (4) a AMC y el 6% (1) a CAZ y STX. Todas presentaron resistencia a uno o más antibióticos y sólo una (cepa DA10 (2), arroyo Corralito) presentó multiresistencia a 5 de los 10 antimicrobianos analizados. Estos datos son coincidentes con los obtenidos por Pereira *et al.* (2013), realizado en el estuario Tagus en Portugal.

La única cepa aislada del arroyo Santa Catalina (DA2, puente ex ruta nacional 24) fue resistente a CEF, antimicrobiano de uso común en humanos y en menor grado en animales, y a AMP, antibiótico de uso común en medicina veterinaria y como promotor de crecimiento animal. En base a este perfil de resistencia se puede inferir que la fuente de contaminación fecal es principalmente de residuo animal.

Con respecto al arroyo Corralito, las dos cepas de *E. coli* aisladas del sitio DA1 (ingreso al área de estudio) presentaron perfiles de resistencia diferentes, ya que la cepa DA1 (1) fue resistente a AMP, mientras que la cepa DA1 (2) lo fue para AMC y AMP, por lo que su contaminación sería originada por la actividad ganadera. La cepa aislada del sitio DA6 (ubicado aguas arriba del ex basural), presentó resistencia a CEF y AMP, mientras que las dos cepas de DA7 (sitio inmediato y aguas abajo del ex basural, donde se observan animales muertos y residuos orgánicos e inorgánicos), mostraron perfiles de resistencia diferentes: DA7 (1) fue resistente a AMC y AMP, mientras que DA7 (2)

presentó resistencia intermedia a estos mismos antimicrobianos. Debido a esto, ambas podrían tener origen en la actividad ganadera (tambo o feed-lot). La resistencia a CEF de las cepas de ambos sitios de muestreo podría explicarse por la presencia de residuos de antibióticos humanos en el ex basural. En DA5 (antes del ingreso a la laguna), las dos cepas aisladas fueron resistentes a CEF y la cepa DA5 (2), a su vez, presentó resistencia a CTX y a AMP. En este sitio se destaca una intensa actividad agrícola con escasa actividad ganadera. De la laguna partida (DL1) se aislaron dos cepas, las cuales fueron resistentes a CEF y AMP. En DA10 (salida de la zona de estudio) se aislaron 3 cepas: DA10 (1), resistente a CEF y AMP, DA10 (3) resistente a CEF, AMP y AMC y DA10 (2), que fue resistente a STX, CEF, AMC y AMP, todos antibióticos de uso humano con menos uso en ganadería, y a CTX y CAZ, de uso exclusivo en humanos. En base a estos perfiles se podría inferir que en este sitio existen fuentes contaminantes de origen animal y humano.

Como se describió anteriormente, el arroyo Corralito posee tramos desconectados de agua estancada, por lo que se esperaba gran variación entre los perfiles de resistencia. Sin embargo, la variación fue escasa. El 70% (7) de las cepas aisladas en este arroyo fue resistente a ampicilina, el 40% (4) a cefalotina y el 30% (3) a ácido clavulánico, lo cual se explicaría por los usos frecuentes de estos antimicrobianos en toda la zona. Además, en este arroyo se encontraron tres cepas resistentes a cefoxitina y la cepa DA10 (2), que fue resistente a su vez a ceftazimida y trimetoprima.

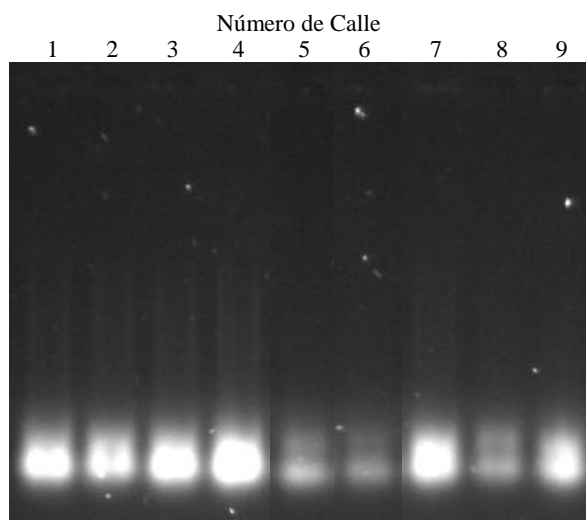
En el caso del arroyo los Jagüeles, caracterizado por el fuerte control antrópico, se aislaron cepas de *E. coli* en los dos sitios muestreados (una cepa a partir del sitio DA8, al ingreso de la zona de estudio, y dos cepas de DA9, egreso de la zona de estudio). La cepa DA8 presentó resistencia a CEF, AMC y AMP, al igual que la cepa DA9 (1), mientras que DA9 (2) sólo fue resistente a CEF y AMP. En ambos sitios predomina la actividad agrícola y en menor medida la ganadera, la cual estaría impactando directamente sobre este recurso hídrico.

Los perfiles de resistencia mostrados por las cepas aisladas de aguas superficiales son diferentes a los presentados por las cepas recuperadas de aguas subterráneas. En aguas superficiales se observó la mayor resistencia para ampicilina y, en ambos ecosistemas, para cefalotina. Además, se observó un mayor porcentaje de cepas resistentes aisladas de muestras de aguas superficiales.

### 5.3. Perfiles genéticos de cepas de *E. coli* aisladas de aguas de acuífero libre

#### 5.3.1. Extracción del ADN genómico

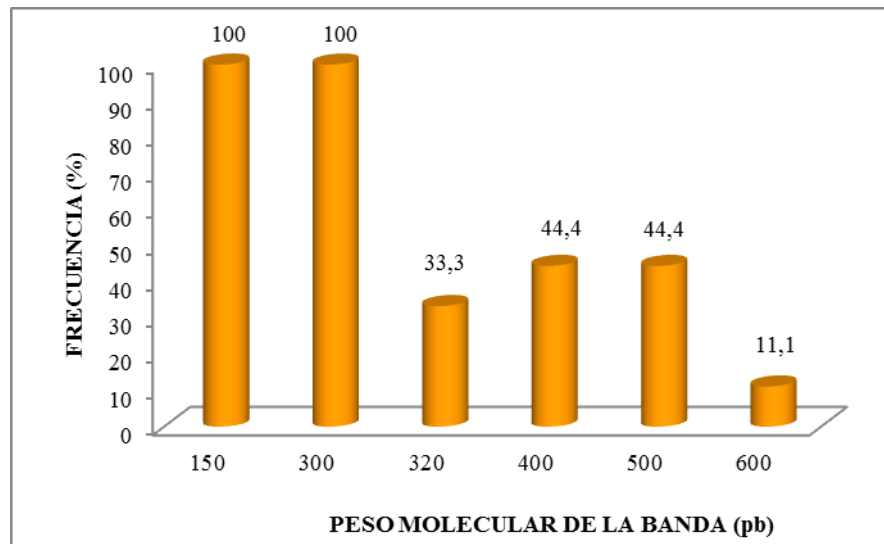
En la figura 10 se observa la corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% para verificar la efectividad de la técnica de extracción de ADN de 9 aislados de *E. coli* de aguas subterráneas (acuífero libre). La metodología utilizada permitió la extracción del ADN genómico de todas las cepas y se obtuvo ADN altamente purificado. Así a partir de 1 ml del cultivo bacteriano se pudieron extraer cantidades suficientes de ADN para realizar la técnica BOX-PCR.



**Figura 10:** Gel de agarosa 0,8 % con ADN bacteriano extraído de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de agua de acuífero libre. Calles 1 a 6: cepas Bloque Hundido. 1=D3; 2=D4 (1); 3=D4 (2); 4=D9; 5=D28 (1); 6=D28 (2). Calles 7 a 9: cepas Bloque Elevado. 7=D10; 8=D11; 9=D13

#### 5.3.2. BOX-PCR: Caracterización de los productos de amplificación

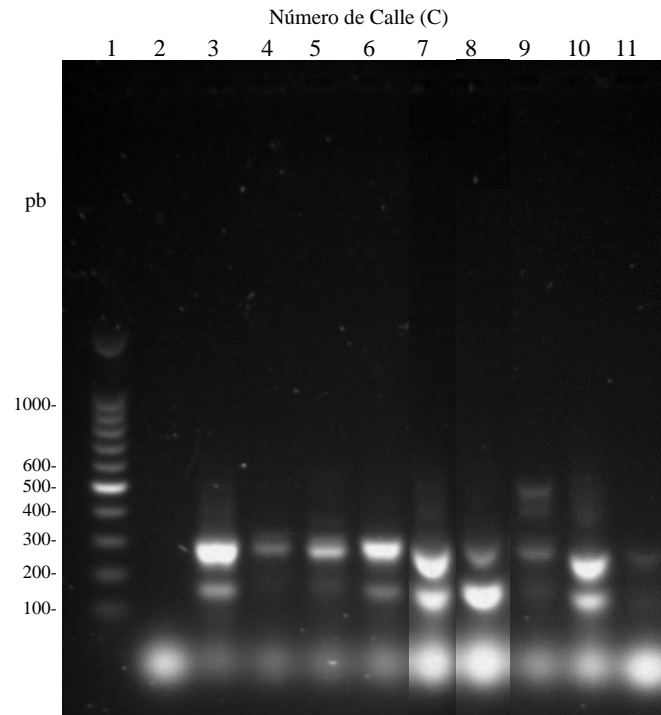
Las 9 cepas de *E. coli* aisladas de aguas de acuífero libre fueron tipificables por la técnica BOX-PCR. Del total de las cepas analizadas, se establecieron 5 patrones diferentes de BOX-PCR (P1 a P5). El análisis de los productos de amplificación reveló que los patrones genéticos o *fingerprints* generados mostraron un rango de 2-6 bandas, con pesos moleculares que oscilaron entre 150 y 600 pb. Las bandas de 300 y 150 pb aparecieron con mayor frecuencia, ya que estuvieron presentes en todos los aislados (Figura 11).



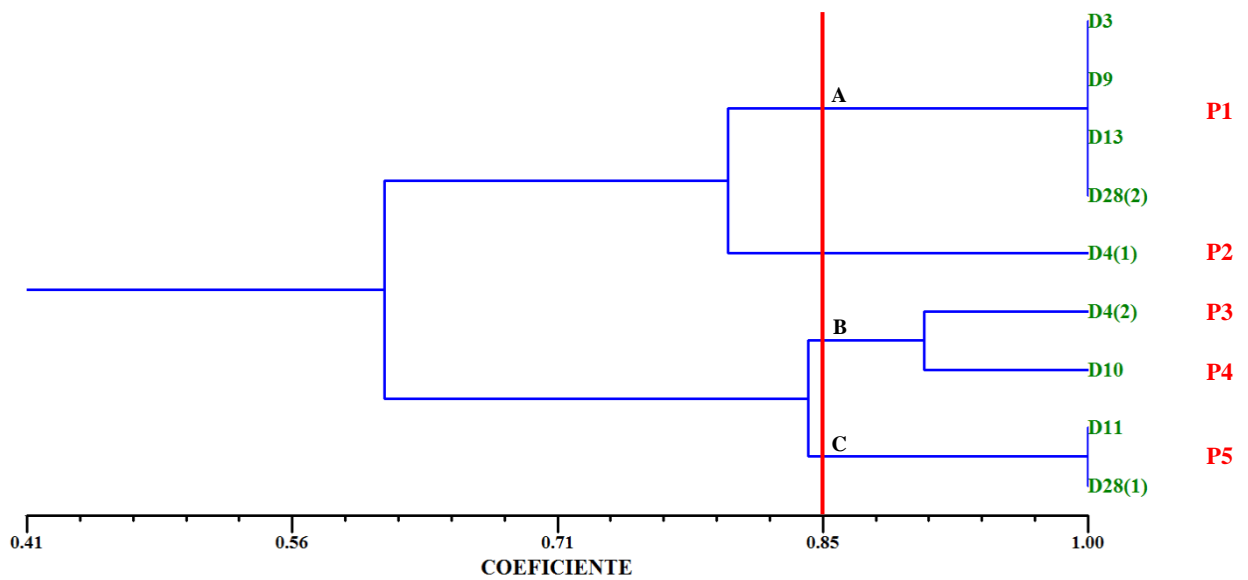
**Figura 11:** Frecuencia (%) de los productos de amplificación por BOX-PCR.

### 5.3.3. Análisis de clústeres de los perfiles genéticos obtenidos por BOX-PCR

A partir de los perfiles genéticos generados mediante BOX-PCR (Figura 12) se determinó la relación genética (homología o similitud) entre las 9 cepas de *E. coli* aisladas de agua de acuífero libre. Para ello se realizó el análisis estadístico UPGMA, utilizando como medida de distancia el coeficiente de DICE. En el dendrograma generado, los patrones moleculares se agruparon en 3 clústeres con una similitud superior al 85% (Figura 13). Cada grupo se caracterizó por número de cepas y por relación de similitud inter e intra-grupo.



**Figura 12.** Productos de amplificación de ADN por BOX-PCR.  
 C 1= Marcador de peso molecular de 100 pb; C 2=Control negativo; C 3-8: Cepas *E. coli* Bloque Hundido (C 3=D3; C 4=D4 (1); C 5=D4 (2); C 6=D9; C 7=D28 (1); C 8=D28 (2). C 9-11: Cepas *E. coli* Bloque Elevado (C 9=D10; C 10=D11; C 11=D13).



**Figura 13:** Dendrograma y perfiles genéticos de productos de amplificación mediante BOX-PCR de **Figura 14:** Estimación de la distribución del agua global.



El clúster A agrupó al patrón genético P1, el cual quedó formado por 4 cepas de *E. coli* aisladas de cuatro puntos de muestreo diferentes (D3, D9 y D28 (2), correspondientes al bloque hundido, y D13 al bloque elevado), las cuales presentaron el mismo perfil genético, es decir, resultaron genéticamente iguales. En el clúster B se agruparon 2 patrones diferentes, P3 y P4, representados por las cepas D4 (2) perteneciente al bloque hundido, y D10, al bloque elevado. Y el clúster C agrupó a P5, formado por dos cepas con el 100% de similitud genética, D11 (bloque elevado) y D28 (1) (bloque hundido).

El patrón P2 representado por la cepa D4 (1) perteneciente al bloque hundido no fue agrupado en ningún clúster por presentar una similitud menor del 85%.

De las 4 cepas que fueron agrupadas en el clúster A, pertenecientes a P1, dos de ellas (D3 y D9) fueron aisladas en sitios de muestreo relacionados con la cría de ganado vacuno. En el sitio D9, en zona rural, se destaca la actividad ganadera en cercanías de la perforación, mientras que el sitio D3, en el ejido urbano, está asociado a una feria de animales (presencia de corrales y bebederos). Con respecto a los sitios donde fueron aisladas las cepas D28 (2) y D13, la agricultura es la única actividad que se desarrolla. Cabe destacar que la cepa D13 pertenece al bloque elevado, en la zona de estudio.

En el clúster B se agruparon dos cepas, la D4 (2) perteneciente al bloque hundido (zona rural pero cercana al ejido urbano) y la D10, perteneciente al bloque elevado. Las actividades realizadas en los sitios de muestreo donde se aislaron estas cepas son similares, destacándose la agricultura. Cabe destacar que en el sitio D10, ubicado en el límite con el bloque hundido, además se realiza cría de ganado porcino y a pocos metros de la perforación se encuentra, aguas arriba, el pozo séptico. Y el sitio D4 se encuentra influenciado por la presencia de feed-lots aguas arriba de la perforación.

En el clúster C, la cepa D11 aislada en zona rural correspondiente al bloque elevado fue genéticamente igual a la cepa D28 (1) proveniente de zona rural en bloque hundido. La primera fue aislada de una perforación ubicada en el límite con el bloque hundido, en cuyos alrededores se destaca la agricultura y, en menor grado, la cría de ovejas y cerdos. Además, a una escasa distancia de la perforación se encuentra el pozo séptico.

## 6. CONCLUSIONES:

✚ Las aguas subterráneas presentan mejor calidad microbiológica que las superficiales, ya que están más protegidas al no tener contacto con el ambiente exterior. A su vez, los acuíferos confinados son menos vulnerables a la contaminación debido a que se encuentran a mayor profundidad que los freáticos.

✚ La calidad bacteriológica de los acuíferos freáticos varía de forma muy puntual, es decir, que pozos vecinos pueden tener calidades diferentes, debido a que cada uno posee distinta vulnerabilidad intrínseca a la contaminación. En el bloque elevado la profundidad de los acuíferos es mayor, por lo que estos presentan mejor calidad que los acuíferos del bloque hundido.

✚ En las aguas superficiales la calidad varía según sus características hidrogeológicas y grado de la influencia antropológica. Arroyos de gran caudal diluyen la contaminación puntual río abajo, mientras que los de menor caudal son más susceptibles. Por otra parte, los que poseen mayor influencia antropológica tendrán mayor vulnerabilidad debido a las actividades asociadas a ellos.

✚ El análisis de la resistencia a antimicrobianos es una herramienta útil para indagar sobre las posibles fuentes de contaminación fecal en ambientes acuáticos. Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones ya que los genes de resistencia pueden perderse o ganarse bajo ciertas condiciones, se pueden producir resistencias cruzadas y, además, este método no provee información sobre bacterias que no son resistentes a los antibióticos analizados. Por lo tanto, esta metodología puede utilizarse de manera complementaria a los métodos de caracterización genotípica.

✚ Las cepas de *E. coli* aisladas de agua superficial presentaron mayor resistencia a ampicilina (antimicrobiano de uso común en ganadería) y, aquellas aisladas de ambos ecosistemas, a cefalotina (antibiótico mayormente utilizado en humanos). Además, se observó un mayor porcentaje de cepas resistentes aisladas de muestras de aguas superficiales.

✚ Las técnicas de rastreo microbiano basadas en el genotipo permiten agrupar cepas relacionadas genéticamente que pueden encontrarse en ambientes distantes, gracias a que la presencia de genes es muy estable en el tiempo. La desventaja de la técnica utilizada en este trabajo (BOX-PCR) es que no siempre refleja los cambios adaptacionales adquiridos en el ambiente donde se encuentran, debido a que solo se analizan secuencias altamente conservadas.

✚ Se puede concluir que ambas técnicas resultaron útiles y complementarias, permitiendo identificar el origen de la contaminación, aportando distintos aspectos de la caracterización microbiana. En este trabajo el origen predominante de la contaminación fecal es animal, lo cual puede atribuirse a la producción bovina, ovina, porcina y avícola, desarrolladas en el área de estudio.

## 7. BIBLIOGRAFÍA:

- Ahmed W, Neller R, Katouli M. 2005. Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and *Escherichia coli* and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8): 4461-4468.
- Ahmed W, Stewart J, Gardner T, Powell D, Brooks P, Sullivan D, Tindale N. 2007. Sourcing faecal pollution: a combination of library-dependent and library-independent methods to identify human faecal pollution in non-sewered catchments. *Water Research*, 41(16): 3771-3779.
- Alexander T, Yanke L, Topp E, Olson M, Read R, Morck D, McAllister T. 2008. Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14): 4405-4416.
- APHA, AWWA, WEF (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation). 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22nd Edition. Part 9000: Microbiological examination. Editores: Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D. y Clesceri, L.S. USA.
- ARAE 2015. Antimicrobial resistance in animals and the environment. *Veterinary Microbiology*, 194: 1-4.
- Baldy Chudzik K y Stosik M. 2005. Specific genomic fingerprints of *Escherichia coli* strains with repetitive sequences and PCR as an effective tool for monitoring freshwater environments. *Polish Journal of Environmental Studies*. 14 (5): 551-557.
- Bauer A, Kirby M, Sherris J, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45 (4): 493-496.
- Baynes R, Abdullah A, Martín-Jiménez T, Lemos M, Lees P, Shojaee F. 2002. Quimioterapia de las enfermedades bacterianas. En: Botana L, Landoni F, Martínez-Jiménez T. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Primera Edición. Madrid, España. pp. 447-473.
- Bergoglio R. 1993. Conceptos básicos. En: Bergoglio R. *Antibióticos*. Quinta Edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 3-4.

- Blarasin M y Cabrera A. 2005. Agua subterránea y ambiente. Primera edición. Ed. Agencia Córdoba Ciencia S.E. Programa de divulgación científica para la enseñanza de las ciencias Cordobensis. ISBN 987-98379-9-1.pp. 5-22.
- Blarasin M, Cabrera A, Matteoda E, Aguirre M, Albo J, Becher Quinodoz F, Maldonado L, Felizzia J, Palacio D, Echevarria K, Frontera H. 2014. Aspectos geoquímicos, isotópicos, contaminación y aptitudes de uso. En: Blarasin M, Cabrera A, Matteoda E. Aguas subterráneas de la provincia de Córdoba. Primera edición. Córdoba, Argentina. pp. 83-148.
- Borsoi A, Santin E, Santos L, Salle C, Moraes H, Nascimento V. 2009. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of Salmonella Heidelberg strains with different virulence gene profile antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. Poultry Science, 88(4):750-758.
- Rademaker J y de Bruijn F. 1997. Chapter 10: Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. En DNA markers: Protocols, Applications and Overviews. Editors: Caetano-Anolle's G. y Gresshoff, P.M. J. Wiley & Sons, New York. pp. 151-171.
- CAA (Código Alimentario Argentino). 2012. Capítulo XII. Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. Artículo 982 (última revisión: diciembre 2018).
- Cabrera A, Blarasin M, Felizzia J. 2012. Cuadernos de uso y manejo de aguas subterráneas: 2. San Basilio-La Brianza. Serie técnica Keipünentum. Primera edición. UniRío Editora.UNRC. ISBN 978-950-665-707-9
- Cabrera A, Blarasin M, Maldonado L. 2017. Groundwater age and hydrothermalism of confined aquifers in the Argentina Pamean plain. Geothermal Energy Journal, 5:6 DOI 10.1186/s40517-017-0064-1.20 pág. Springer.
- Cabrera A. 2009. Evolución hidrogeoquímica e isótopos ambientales del sistema acuífero asociado a los ambientes morfotectónicos de la falla regional Tigre Muerto. Córdoba. Argentina. Tesis Doctoral. UNRC. Inédito. 354 pág.
- Calcagno A, Mendiburo N y Novillo M. 2000. Informe sobre la gestión del agua en la República Argentina. Primera edición. Argentina. pp. 22-120.
- Carlos C, Alexandrino F, Stoppe NC, Sato MI, Ottoboni LM. 2012. Use of *Escherichia coli* BOX-PCR fingerprints to identify sources of fecal contamination of water bodies in the state of Sao Paulo, Brazil. Journal of Environmental Management, 93(1): 38-43.

- Cercenado E, Saavedra-Lozano J. 2009. El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*, 7(4): 214-217.
- Chiesa L, Nobile M, Arioli F, Britti D, Trutic N, Pavlovic R, Panseri S. 2015. Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 185: 7-15.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27<sup>th</sup> ed. Supplement M100-S27 .Vol. 37, N° 1. ISBN 1-56238-1-56238-805-3 (Electronic).
- Díaz Delgado C, Alberich M, Lopez Vera F. 2005. Hidrología Subterránea. En: Recursos Hídricos. Conceptos básicos y estudios de casos en Iberoamérica. Piriguazú Ediciones/ CIRA-UAEM. Pag: III-3 a III-101.
- Dombek P, Johnson L, Zimmerley S, Sadowsky M. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (6): 2572-2577.
- Egervarn M, Englund S, Ljunge M, Wiberg C, Finn M, Lindblad M, Borjesson S. 2017. Unexpected common occurrence of transferable extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in Swedish surface waters used for drinking water supply. *Science of the Total Environment*, 587-588: 466-472.
- Errecalde, J. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. *FAO Producción y Sanidad Animal*, 162. ISSN 1014-1200. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm>
- Gambero, M.L. 2014. Caracterización molecular de microorganismos aislados de ecosistemas acuáticos superficiales y subterráneos. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Inédito. UNRC.
- Gambero L, Blarasin M, Bettera S, Matteoda E. 2017a. Bacterial indicators and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in groundwater. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 3(11): 17-22.
- Gambero M, Blarasin M, Bettera S, Giuliano Albo J. 2017b. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from surface water and groundwater in a rural environment. *Journal of Water and Health*, 15.5: 757-765. ISSN 1477-8920-EISSN 1996-7829.
- Gambero L, Blarasin M, Bettera S, Giuliano Albo J. 2018. Tracing contamination sources through phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from surface

water and groundwater in an agro-ecosystem. *Hydrological Sciences Journal*, 63(8): 1150-1161. DOI: [10.1080/02626667.2018.1483582](https://doi.org/10.1080/02626667.2018.1483582).

- Giuliano Albo M, Blarasin M, Panerello H. 2015. Evaluación de la geoquímica e isótopos del nitrato en el acuífero libre de una llanura con actividad agropecuaria, Córdoba, Argentina. *Ingeniería, Revista Académica de la Facultad de Ingeniería Universidad Autónoma de Yucatán*, 19: 24-38.
- Gourmelon M, Caprais M, Ségura R, LeMennec C, Lozach S, Piriou, Rincé A. 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in french estuaries. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15): 4857-4866.
- Hamelin K, Bruant G, El-Shaarawi A, Hill S, Edge T, Fairbrother J, Harel J, Maynard C, Masson L, Brousseau R. 2007. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit river areas. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2): 477-484.
- Hamilton M, Yan T, Sadwsky M. 2006. Development of goose- and duck-specific DNA markers to determine sources of *Escherichia coli* waterways. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6): 4012-4019.
- Hernández-Barrera J, Angarita-Merchán M, Prada-Quiroga C. 2017. Impacto del uso de antimicrobianos en medicina veterinaria. *Revista Ciencia y Agricultura*, 14(2): 27-38.
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Stanley J, Williams S. 2000. Gram negative bacteria. En: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. ninth edition. Philadelphia, USA. ISBN-10:0-683-00603-7.
- Ibekwe A, Murinda S, Graves A. 2011. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from human and animal sources uncovers multiple resistances from human sources. *PLoS One* 6(6): e20819. doi:10.1371/journal.pone.0020819.
- Kümmerer K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere*, 75(4): 435-441.
- Kyaw C, De Araujo R, Lima R, Gondim G, Brígido M, Giuliano L. 2003. Evidence for the presence of a type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC). *Infections, Genetics and Evolution*. 3 (2): 111-117.

- Loeffelholz M y Deng H. 2006. Chapter 11: PCR and its variations. En *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Tang YW y Stratton C (editors). Springer US. pp: 166-183. [https://doi.org/10.1007/0-387-32892-0\\_11](https://doi.org/10.1007/0-387-32892-0_11)
- Maal-Bared R, Bartlett K, Bowie W, Hall E. 2013. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. *Science of the Total Environment*, 443: 315-323.
- Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. 2009. Capítulo 27: Control del crecimiento microbiano. En: Brock, *Biología de los Microorganismos*. Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Duodécima Edición. Madrid, España. pp. 882-887.
- Malathum K, Singh K, Weinstock G, Murray B. 1998. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 (1): 211-215.
- Maldonado L, Bécher Quinodóz F, Cabrera A, Blarasin M, Lutri V, Matteoda E, Albo J. 2018. Hydrogeochemical features and groundwater renewal rate estimates from deep aquifers in the Pampean plain, Córdoba province, Argentina. *Journal of South American Earth Sciences*, 85: 126-134.
- McLellan S. 2004. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (8): 4658-4665. doi: [10.1128/AEM.70.8.4658-4665.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4658-4665.2004)
- Moe C. 2007. Waterborne Transmission of Infectious Agents. En: Hurst C, Garland J, Mills A., Crawford R, Lipson D, Stetzenbach, L. *Manual of Environmental Microbiology*. Tercera edición. Washington, D. C., Estado Unidos. pp. 219-378.
- Mohapatra B, Broersma K, Mazumder A. 2007. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiology Letters*, 277, (1): 98–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00948.x>
- MSAL (Ministerio de Salud de la República Argentina). 2017. Abastecimiento y Calidad de Agua. Buenos aires, Argentina. Ministerio de la salud; 2017. [actualizado: 2017; citado 7 febrero 2018]. Disponible en: [http://www.msal.gov.ar/politicassocioambientales/images/stories/descargas/recursos/programa\\_abastecimiento.pdf](http://www.msal.gov.ar/politicassocioambientales/images/stories/descargas/recursos/programa_abastecimiento.pdf)



- MSAL (Ministerio de Salud de la República Argentina). 2018. msal.gob.ar [internet]. Buenos aires, Argentina. Ministerio de la salud; 2017. [actualizado: 2018; citado 7 febrero 2018]. Disponible en:  
[http://www.msal.gob.ar/politicassocioambientales/images/stories/descargas/recursos/programa\\_calidad.pdf](http://www.msal.gob.ar/politicassocioambientales/images/stories/descargas/recursos/programa_calidad.pdf)
- Mulvey M, Susky E, McCracken M, Morck D, Read R. 2009. Similar cefoxitin-resistance plasmids circulating in *Escherichia coli* from human and animal sources. *Veterinary Microbiology*, 134(3-4): 279-287.
- Okeke B, Thomson M, Moss E. 2011. Occurrence, molecular characterization and antibiogram of water quality indicator bacteria in river water serving a water treatment plant. *Science of the Total Environment*, 409(23): 4979-4985.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2006. Guías para la calidad de agua potable. Microorganismos indicadores e Índices. Tercera edición, Volumen 1. pp. 231-240. Ginebra, Suiza.
- OMS y UNICEF (Organización Mundial de la Salud y Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia). 2017. Progresos en materia de agua potable, saneamiento e higiene. Informe de actualización de 2017 y línea de base de la ODS. Ginebra, Suiza. ISBN 978-92-4-351289-1. pp. 10-18.
- Osińska A, Korzentewska E, Harnisz M, Niestępski S. 2017. The prevalence and characterization of antibiotic-resistance and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal wastewater system and their environmental fate. *Science of the Total Environment*, 577: 367-375.
- Pereira A, Santos A, Tação M, Alves A, Henriques I, Correia A. 2013. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*, 461-462: 65-71.
- Pereyra E, Lombardo D, Gambero M, Morra N, Bettera S, Matteoda E, Cabrera A. Comparison of resistance profiles to antibiotics of *Escherichia coli* isolated from water of different agroecosystems. 2018. *Biocell* 42(1): A60. ISSN 1667-5746 (online version). Argentina.
- Pérez Trallero E, López M, Zamorano A. Bacilos Gram negativos. 2003. En: De la Rosa M y Prieto J. *Microbiología en Ciencias de la Salud, Conceptos y Aplicaciones*. Segunda Edición. Madrid, España. pp. 91-95.

- Prieto T. 2012. Calidad microbiológica y físico-química de aguas del área comprendida entre Punta del Agua-General Deheza. Tesis de licenciatura en Microbiología. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Sayah R, Kaneene J, Johnson Y, Miller R. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic -and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3): 1394-1404.
- Schweitzer L, Noblet J. 2018. Water Contamination and Pollution. En: Torok B y Dransfield T. *Green chemistry, an inclusive approach*. Primera Edición. San Bernardino, Estados Unidos. pp. 261-290.
- Sidrach-Cardona R, Hijosa-Valseiro M, Marti E, Balcázar J, Becares E. 2014. Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges. *Science of the Total Environment*, 488-489: 220-227.
- Slaymaker T, Johnston R. 2018. Safe and affordable drinking water for all. En: uhlenbrook S. *Synthesis Report SDG 6, Water and Sanitation*. Primera edición. New York, Estados Unidos. pp. 30-42.
- Somarelli J, Makarewicz J, Sia R, Simon R 2007. Wildlife identified as major source of *Escherichia coli* in agriculturally dominated watersheds by BOX A1R-derived genetic fingerprints. *Journal of Environmental Management*. 82 (1): 60-65
- Toranzos G, McFeters G, Borrego J, Savill M. 2007. Chapter 20: Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. En: *Manual of Environmental Microbiology*. Third Edition. Hurst C, Crawford R, Garland J, Lipson D, Mills A, Stetzenbach L. Washington, D.C., Estados Unidos. pp. 205-207.
- Tortora G, Funke B, Case C. 2007. Fármacos antimicrobianos. En: Tortora G, Funke B y Case C. *Introducción a la Microbiología*. Novena Edición. Madrid, España. pp. 584-595.
- Unno T, Han D, Jang G, Lee S, Kim J. H, Ko G, Kim G, Ahn J, Kanaly A, Sadowsky J, Hur H. 2010. High diversity and abundance of antibiotic-resistance *Escherichia coli* isolated from humans and farm animal hosts in Jeonnam province, South Korea. *Science of total environment*. 3499-3506.

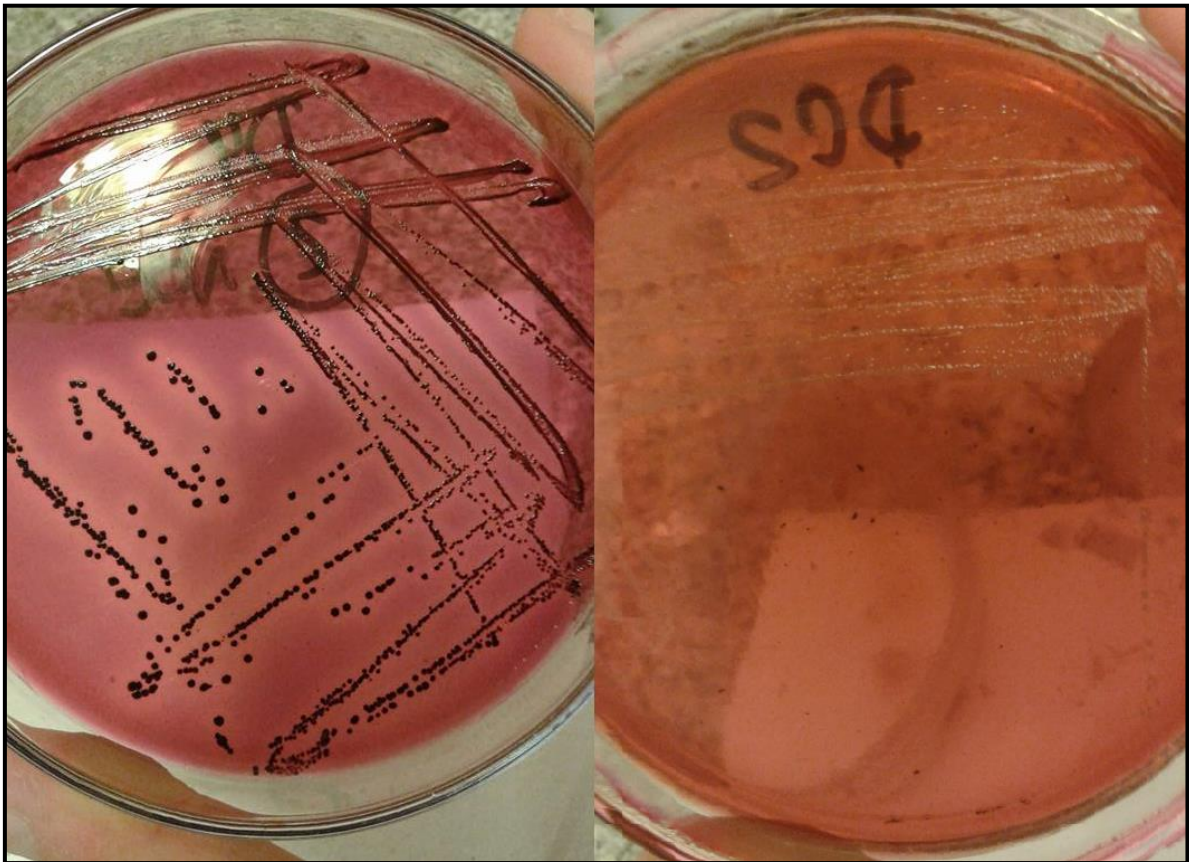
- OMS (Organización Mundial de la Salud).2018. who.int. [internet]. Ginebra, Suiza. Organización mundial de la salud; 2017 [actualizado 19 de febrero 2018; citado 3 de marzo 2018] disponible en:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs392/es/>

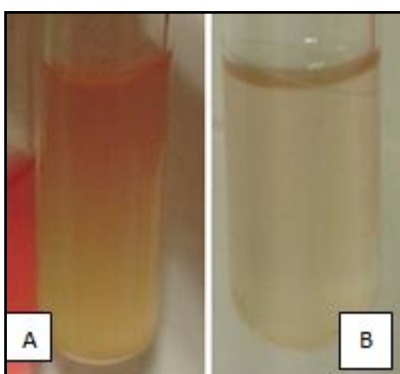
- Zhao S, Liu X, Cheng D, Liu G, Liang B, Cui B, Bai J. 2016. Temporal-spatial variation and partitioning prediction of antibiotics in surface water and sediments from the intertidal zones of the Yellow River Delta, China. *Science of the Total Environment*, 569-570: 1350-1358.

- Zhao X, Wang J, Zhu L, Ge W, Wang J. 2017. Environmental analysis of typical antibiotic-resistant bacteria and ARGs in farmland soil chronically fertilized with chicken manure. *Science of the Total Environment*, 593-594: 10-17.

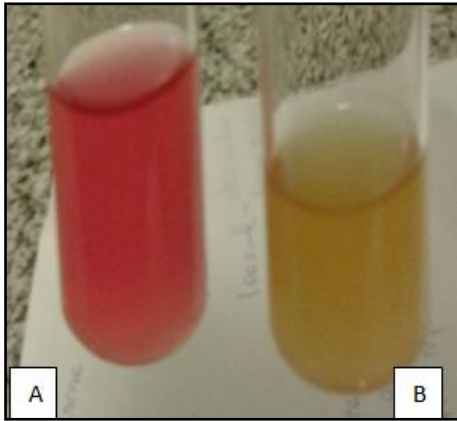
8. ANEXO



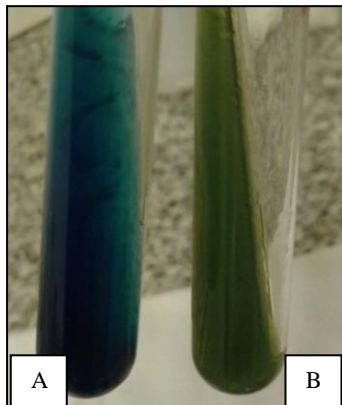
**Figura 15:** Agar EMB: A) Colonias típicas de *E. coli*; B) Colonias lactosa negativas



**Figura 16:** Prueba del Indol: A) Positivo; B) Negativo



**Figura 17:** Prueba Rojo de Metilo: A) Positivo; B) Negativo



**Figura 18:** Prueba del Citrato Sódico: A) Positivo; B) Negativo



**Figura 19:** TSI acido/acido con formación de gas



**Figura 20:** Prueba de Lisina: A) Negativa; B) Descarboxilación Positiva



**Figura 21:** Ureasa Negativa



**Figura 22:** Fermentación de los azucares: A) Positivo; B) Negativo



**Figura 23:** Medio de cultivo Cetrimide: A) colonias típicas de *Pseudomonas*; B) otras colonias